

بسمه تعالی



## گزارش نهایی طرح

ایجاد دانش فنی کنترل عملکرد سلولهای قلبی بر اساس ژنتیک نوری (اپتوژنتیک) در سلولهای  
کاردیومیوسیت موش صحرایی

کد طرح مصوب جهاد دانشگاهی: ۱۱-۲۴۴۱

کد مصوب کمیته اخلاق در پژوهش: IR.ACECR.IBCR.REC.1395.22

مسئول اجرای طرح: دکتر غلامرضا اسماعیلی جاوید

واحد سازمانی مجری: جهاد دانشگاهی علوم پزشکی تهران، مرکز تحقیقات لیزر در پزشکی

گروه پژوهشی: ترمیم نوری بافت

ماه و سال اختتام طرح:

اسفند ۱۳۹۶

مشخصات مسئول و همکاران طرح مطابق پرسشنامه مصوب:

ردیف	نام و نام خانوادگی	مسئولیت در طرح	تخصص	وابستگی سازمانی	جمع کل نفر ساعت همکاری در طرح
۱	دکتر غلامرضا اسماعیلی جاوید	مجری طرح	پزشک، بیوفیزیک	استادیار جهاد دانشگاهی	۲۴۰
۲	دکتر بهرام گلیایی	مشاور طرح	بیوفیزیک	استاد دانشگاه تهران	۲۴
۳	دکتر مجید پرنور	همکار طرح - مشاور طرح در کلونینگ	بیوتکنولوژی پزشکی	استادیار جهاد دانشگاهی	۲۴۰
۴	هدا کشمیری نقاب	همکار طرح - انجام مطالعات سلولی - الکتروفیزیولوژی	بیوفیزیک	پژوهشگر جهاد دانشگاهی	۲۴۰
۵	هاجر واتقی	همکار طرح - مطالعات ژنتیکی	ژنتیک مولکولی	پژوهشگر جهاد دانشگاهی	۴۰

تقدیر و تشکر:

تقدیر و تشکر از جناب آقای دکتر علی اکبر صبوری استاد محترم گروه بیوفیزیک مرکز تحقیقات بیوشیمی و بیوفیزیک دانشگاه تهران که با استفاده از حمایت های بیدریغشان در انجام این طرح به خصوص تهیه وکتور حامل ژن مورد مطالعه از شرکت Addgene با همکاری تیم تحقیقاتی شان در کشور چین، انجام این طرح را میسر نمودند.

تقدیر و تشکر از سرکار خانم دکتر رضوان اسمعیلی استادیار محترم گروه ژنتیک سرطان پژوهشکده معتمد که در هنگام بروز مشکلات در انجام این طرح، همواره و بی شائبه با راهنمایی های ارزشمندشان، تیم تحقیقاتی را راهنمایی فرمودند.

## چکیده فارسی

تحریک الکتریکی ماهیچه قلب با استفاده از ضربانسازهای الکتریکی قلبی و دستگاههای الکتروشوک از فناوریهای شناخته شده برای بیماران قلبی هستند که استفاده از آنها با محدودیتهای بسیاری از جمله حس درد و شوک ناگهانی و غیره فمند بودن به همراه شکستگی هادی های فلزی، محدودیت طول عمر باتری و تداخل با نیروهای مغناطیسی قوی اشاره کرد. روش "اپتوژنتیک"<sup>1</sup> آینده بسیار روشنی از توسعه ضربان سازهای مبتنی بر نور نسل جدید خواهد داشت و می تواند راه حل جدیدی در کنترل عملکردهای قلب ارائه کند. هدف از این مطالعه، ایجاد دانش فنی توسعه اپتوژنتیک برای کنترل عملکردی بر روی سلولهای قلبی در محیط کشت می باشد که امکان تحریک و بازدارندگی با استفاده از این تکنیک بر روی سلولهای قلبی وجود داشته باشد. ابتدا با القای بیان پروتئین کانالرودوپسین بر روی سلولهای قلبی موش صحرایی، امکان کنترل عملکرد انقباضی سلولهای قلبی تحت تابش نور بدست آورد. در این مطالعه، با استفاده از ناقل لنتی ویروس ژن کانالرودوپسین-۲ ابتدا به سلولهای HEK239T و سپس به کاردیومیوسیت های جدا شده از نوزاد موش صحرایی انتقال داده شد. یافته های مطالعه نشان می دهد که میزان انتقال و بیان پروتئین غشایی کانالرودوپسین-۲ بیش از ۹۸ درصد است. همچنین به لحاظ عملکردی باعث افزایش غلظت کلسیم داخل سلولی می شود. این مطالعه نشان داد که استفاده از ناقل ویروسی برای انتقال ژن و بیان پروتئین کانالرودوپسین ۲ در کاردیومیوسیت نوزاد موش صحرایی با بازدهی بسیار بالایی همراه است.

کلیدواژه ها: اپتوژنتیک، کاردیومیوسیت، کانالرودوپسین ۲، لنتی ویروس

---

<sup>1</sup> Optogenetics

چکیده فارسی	
فصل اول: کلیات پژوهش	
مقدمه و بیان مسئله	
تعاریف مفاهیم	
فصل دوم: مبانی نظری و پیشینه پژوهش	
فصل سوم: اهداف	
فصل چهارم: روش پژوهش	
نوع مطالعه	
جمعیت (واحد) مطالعه	
مکان و زمان مطالعه	
حجم نمونه	
روش نمونه‌گیری	
روش اجرا	
روش تجزیه و تحلیل	
ملاحظات اخلاقی طبق راهنماهای عمومی و اختصاصی اخلاق در پژوهش	
فصل پنجم: یافته‌های پژوهش	
فصل ششم: بحث و نتیجه‌گیری	
مروری بر یافته‌های پژوهش	
بحث	
محدودیت‌ها	
پیشنهادها	
نتیجه‌گیری	
منابع	
پیوست (مواردی مانند پرسشنامه - فرم رضایتنامه)	
چکیده انگلیسی	

فصل اول  
کلیات پژوهش

## مقدمه و بیان مساله:

با پیشرفتهایی که در حوزه سلامت و علوم پزشکی صورت گرفته است هر چند خبری از شیوع گسترده بیماریهای عفونی و مرگ و میر ناشی از این بیماریها نیست و امید به زندگی به طور چشمگیری افزایش یافته است ولی در مقابل بیماری های تحلیل برنده ناشی از روندهای پیری و مزمن افزایش قابل ملاحظه ای یافته است. در حال حاضر بیشترین علت مرگ و میر در کشورهای توسعه یافته مربوط به حوادث عروقی قلبی و مغزی بوده هر چند که سوانح و تصادفات نیز از علل شایع مرگ و میر در جهان به شمار می رود (۱).

اپتوژنتیک<sup>۱</sup> ترکیبی از علم ژنتیک و روشهای نوری به منظور ایجاد یا حذف عملکردهای مشخص در سلولهای تخصص یافته است (۲). به عبارتی، اپتوژنتیک ترکیبی از اپتیک، ژنتیک و مهندسی زیستی است برای تحریک یا مهار فعالیت سلولها از طریق پروتئین-های حساس به نور می باشد. در این روش با استفاده از پروتئین های غشایی حساس به نور از خانواده اپسین ها و بیان آنها به روشهای مهندسی ژنتیک و زیستی در سلولهای تخصص یافته از جمله سلولهای قلبی و عصبی، این امکان را به دست می دهد که با توجه به خصوصیات هر یک از پروتئین های مورد نظر با پلاریزاسیون<sup>۲</sup> یا هیپرپلاریزاسیون<sup>۳</sup> موجب تحریک یا مهار فعالیتهای سلولها گردد(۳).

در اپتوژنتیک از گروهی از پروتئین های غشای مورد استفاده قرار می گیرد که بدنال تابش پرتوی نوری با طول موج مشخص موجب تغییر ساختار پروتئین ها شده و امکان عبور برخی از یونها را ایجاد می شود. این گروه از پروتئین ها به دلیل قرار گرفتن مولکول رتینا و ایزومراسیون نوری آن به بدنال تابش برخی از طول موجهای مشخص نور، باعث تغییرات ساختاری و درنهایت امکان عبور یونها را بدست می دهد. از مهمترین و شناخته ترین پروتئین های این گروه می توان به اپسین ها<sup>۴</sup> اشاره کرد. اپسین ها پروتئین-های غشایی با وزن مولکولی ۵۰-۳۰ کیلودالتون هستند. این پروتئین ها، جزء پروتئینی مولکول رودوپسین<sup>۵</sup> در مهره داران نیز بوده و می توانند به عنوان گیرنده نوری عمل کنند. پروتئین های پذیرنده نور در سلولهای مهره داران در ساختار سه بعدی مشابه با اپسین های میکروبی بوده ولی به لحاظ توالی اسیدهای آمینه متفاوت هستند. اپسین های میکروبی علاوه بر عملکرد کانالی، می توانند به عنوان پمپ های یونی وابسته به نور یا حساسگرهای نوری عمل می نمایند (شکل ۱).

<sup>1</sup> Optogenetics

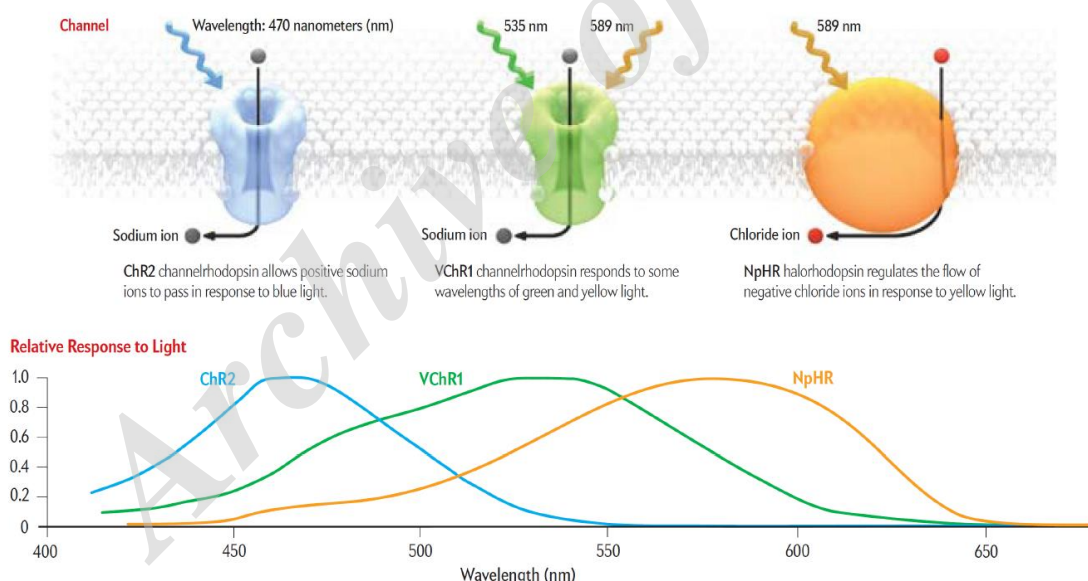
<sup>2</sup> Polarization

<sup>3</sup> Hyperpolarization

<sup>4</sup> Opsin

<sup>5</sup> Rhodopsin

مکانیسم تغییر ساختار پروتئینهای اپسین به ایزومریزاسیون<sup>۱</sup> نوری مولکول رتینا موجود در داخل این پروتئین ها بر می گردد. مولکول رتینا در اپسین های نوع یک یا اپسین های میکروبی در حال طبیعی و غیرتحریر شده به صورت ترانس<sup>۲</sup> قرار دارند. این حالت ترانس رتینا می تواند با دریافت مقداری اندکی انرژی در محدوده امواج نور مرئی به حالت ۱۴ سیس رتینا<sup>۳</sup> ایزومره گردد در حقیقت، عدم تبدیل حالت ترانس به حالت سیس به دلیل وجود سد انرژی است. این امکان را در حالت عادی و بدون دادن انرژی خارجی به پروتئین ایجاد نمی شود (۴). پس از دریافت انرژی نور در محدوده مرئی و عبور از سد انرژی، موجب تغییر در ساختار فضایی پروتئین اپسین شده و عبور یونها و بدنال آن یا فعال شدن یک سری از سیگنالهای درون سلولی منجر می شود. این مسیر در اپسین های نوع دو یا اپسین های مهره داران به صورت معکوس می باشد به طوری که در حالت پایه (تاریکی) مولکول رتینا به صورت ۱۱ سیس رتینا می باشد و با دریافت انرژی در محدود نور مرئی با عبور از سد انرژی به حالت ترانس رتینا در می آید و در نهایت موجب تغییر در شکل فضایی پروتئین خواهد شد (۵) (شکل ۲).

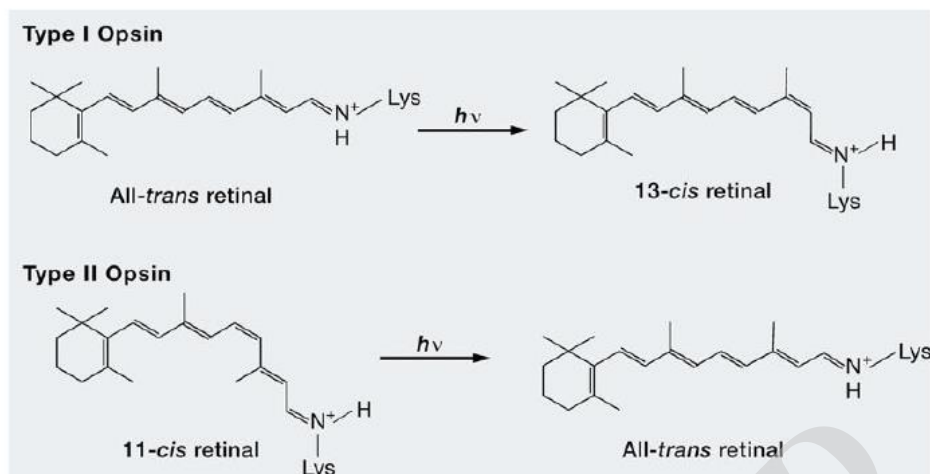


شکل ۱- اپسین های میکروبی و طول موج اختصاصی آنها که موجب انتقال یونها به داخل سلول می گردد. (۷)

<sup>1</sup> Isomerization

<sup>2</sup> Trans

<sup>3</sup> 14-cis retina



شکل ۲: ساختار اپسین نوع ۱ و ۲ و نحوه عملکرد آنها در پس از تابش نور (۸)

پس از انتخاب یک پروتئین مناسب از خانواده اپسین های میکروبی در قدم دوم می باید با استفاده از فناوری ژنتیک، امکان بیان این پروتئین در سلول جانوری به وجود آید. بیشترین مطالعه در سالهای اخیر با استفاده از فناوری اپتوژنتیک در حوزه مطالعه شبکه های عصبی بر روی مدل های تجربی بوده است. برای ورود اختصاصی ژن پروتئین مذکور از سه روش استفاده می شود. این روشها به ترتیب عبارت از ترانسفکشن، انتقال از طریق وکتورهای ویروسی و در نهایت تولید حیوانات ترانس ژنیک می باشد (۶).

اپتوژنتیک در سال ۲۰۱۰ مجله Nature اپتوژنتیک را به عنوان روش سال انتخاب نمود (۱۰). امیدهای بسیاری در خصوص درمان و بازتوانبخشی بیماریهای مزمن عصبی و قلبی با توجه به دانش اپتوژنتیک به وجود آمده است. در سالهای اخیر مطالعات بسیاری در خصوص استفاده از این روش در کنترل عملکرد سیستم های عصبی در مدل های سلولی و حیوانی با موفقیت به مرحله اجراء درآمده است.

امروزه استفاده از ضربان سازها<sup>۱</sup> توانسته برای بسیاری از بیماران قلبی موقعیتی را فراهم نماید که بتوانند از یک زندگی طبیعی برخوردار باشند و بطور کلی طول عمر را در آنان افزایش دهد. ضربان سازها به معنی تولید کننده ضربان قلب با استفاده از انرژی الکتریکی می باشد اگر سیستم هدایتی قلب به هر دلیلی دچار اختلال شود تحریک از منبع خارجی امکان پذیر است که این کار توسط مولد الکتریکی صورت می گیرد که آن را ضربان ساز گویند. تحریک الکتریکی ماهیچه قلب با استفاده از ضربان سازهای الکتریکی قلبی و دستگاههای الکتروشوک از فناوریهای شناخته شده برای بیماران قلبی هستند. اگرچه استفاده

<sup>1</sup> Pacemaker



از این فن آوری ها به طور مستمر در درمان به کار گرفته شده است ولی استفاده از آنها از محدودیتهای برخوردار است. از جمله محدودیتهای حس درد شدید در هنگام تخلیه الکتریکی و استرسهای مزمن و شکستگی هادی های فلزی، محدودیت طول عمر باتری و تداخل با نیروهای مغناطیسی قوی اشاره کرد. روش اپتوژنتیک آینده بسیار روشنی از توسعه ضربان سازهای مبتنی بر نور نسل جدید خواهد داشت. و می تواند راه حل جدیدی در کنترل عملکردهای قلب ارائه کند.

با توجه به پتانسیل های فراوان روش کنترل عملکرد سلولهای قلبی و عصبی به روش اپتوژنتیک، با مدل سازی این روش در رده سلولی قلبی و بهینه سازی این فرآیند، ضمن کسب دانش فنی، رویکردهای جدید و پتانسیل آن در موارد درمانی مورد شناسایی قرار گیرد.

Archive of SID

## تعاریف مفاهیم:

**اپتوژنیک:** ترکیبی از اپتیک، ژنتیک و مهندسی زیستی است برای تحریک یا مهار فعالیت سلولها از طریق پروتئین-های حساس به نور می باشد.

**ضربان ساز:** روشی برای تولید پتانسیل عمل در غشای سلولهای تحریک پذیر از جمله سلولهای قلبی به منظور ایجاد عملکرد (انقباض)

**کانالورودپسین-۲:** پروتئین غشای حساس به نور نوعی باکتری که با تابش نور، عملکرد کانالی در سطح غشای سلول ایجاد می کند.

Archive of SID

فصل اول  
مبانی نظری و پیشینه پژوهش

در اپتوژنتیک گروهی از پروتئین‌های غشای مورد استفاده قرار می‌گیرد که دنبال تابش پرتوی نوری با طول موج مشخص موجب تغییر ساختار پروتئین‌ها شده و امکان عبور برخی از یونها ایجاد می‌شود. این گروه از پروتئین‌ها به دلیل قرار گرفتن مولکول رتینا و ایزومراسیون نوری آن به دنبال تابش برخی از طول موجهای مشخص نور، باعث تغییرات ساختاری و در نهایت امکان عبور یون‌ها را بدست می‌دهد. از مهمترین و شناخته‌ترین پروتئین‌های این گروه می‌توان به اسپین‌ها اشاره کرد. اسپین‌ها پروتئین‌های غشایی با وزن مولکولی ۳۰-۵۰ کیلودالتون هستند. این پروتئین‌ها، جزء پروتئینی مولکول رودوپسین در مهره داران نیز بوده و می‌توانند به عنوان گیرنده نوری عمل کنند. تاریخچه کشف و شناسایی اسپین‌ها به دهه ۱۹۹۰-۱۹۷۰ بر می‌گردد. نوعی باکتری به نام هالوباکتریوم سالیناروم<sup>۱</sup> که در محیط‌های نمکی (غلظت بالای ۴ مولار نمک) زندگی می‌کند، از انرژی نور به عنوان تنها منبع انرژی به واسطه رتینال پروتئین باکتیریورودوپسین<sup>۲</sup> استفاده می‌کند. باکتیریورودوپسین پمپ پروتون وابسته به نور می‌باشد که انرژی نور را به شیب پروتون تبدیل کرده و در تولید ATP مورد استفاده قرار می‌گیرد. علاوه بر باکتیریورودوپسین، هالوباکتریوم سالیناروم نیز شامل رنگدانه فتوسنتتیک<sup>۳</sup> با رنگدانه رتینال می‌باشد که هالورودوپسین<sup>۴</sup> نام دارد. هالورودوپسین پمپ کلرید وابسته به نور می‌باشد که به هالوباکتریوم‌ها اجازه زندگی در محیط‌های نمکی با غلظت بالا را می‌دهد.

در سال ۱۹۹۹ اوکونو<sup>۵</sup> و همکاران از هالورودوپسین‌ها در شرایط فیزیولوژیک استفاده کردند. نتایج تحقیقات آن‌ها نشان داد که برخلاف هالوباکتریوم سالیناروم، پروتئین هالورودوپسین باکتری ناتروموناس فارانیس<sup>۶</sup> در غلظت‌های فیزیولوژیک کلرید نیز عملکرد خود را داشتند. در سال ۲۰۰۲ میزنبروک<sup>۷</sup> و همکارانش سه ژن قابلیت تحریک نوری<sup>۸</sup> را در نورون‌های هیپوکمپ مگس میوه دروزوفیلا<sup>۹</sup> با موفقیت بیان کردند. در سال ۲۰۰۳ ناگل<sup>۱۰</sup> و همکاران از پروتئین کانالورودوپسین-۲ برای دپلاریزاسیون سلول‌های تحت تابش اووسیت و رده سلولی HEK استفاده کردند (۹). در نهایت اولین مقاله اپتوژنتیک در سال ۲۰۰۵ توسط بویدون<sup>۱۱</sup> و همکارانش از موسسه فناوری ماساچوست (MIT) به چاپ رسید (۱۰). انتشار اولین روش اپتوژنتیک و کنترل عملکرد

<sup>1</sup> Halobacterium salinarum

<sup>2</sup> Bacteriorhodopsin

<sup>3</sup> Photosynthetic

<sup>4</sup> Halorhodopsin

<sup>5</sup> Okuno

<sup>6</sup> Natronomonas pharaonis

<sup>7</sup> Miesenbrook

<sup>8</sup> Phototransduction

<sup>9</sup> Drosophila

<sup>10</sup> Nagel

<sup>11</sup> Boydon

سلولهای مهره داران به شدت مورد توجه پژوهشگران و متخصصان حوزه علوم اعصاب قرار گرفت. در ادامه بویدون و همکارانش اولین مقاله خود را در زمینه کاربرد اپتوژنتیک بر روی مغز پریمات در سال ۲۰۰۹ به چاپ رسانده که این امر نقطه ی عطفی جهت کاربردهای کلینیکی اپتوژنتیک بود (۱۱). در سال ۲۰۱۴ تیمی از پژوهشگران امریکایی، از این تکنولوژی نوظهور در درمان کوری رتینیت پیگمنتوزا<sup>۱</sup> استفاده کردند. در این بیماری سلولهای مخروطی و استوانه‌ایی چشم از بین می‌رود. هرچند که این فناوری نوظهور است ولی شواهد بیانگر اینست که این فناوری گامی بسیار جدی در حل مشکلات مرتبط با سیستم قلبی و درمان نارسایی های قلبی خواهد داشت. امید است که در آینده‌ایی نه چندان دور این تکنولوژی در درمان بیماری‌ها در انسان مفید واقع گردد.

کاربردهای قلبی اپتوژنتیک اولین بار توسط بروگمن<sup>۲</sup> و همکارانش بر روی سلولهای قلبی پستانداران به مرحله اجراء درآمد (۹). این تیم تحقیقاتی برای اولین بار توانستند یک موش دستکاری ژنتیکی<sup>۳</sup> که پروتئین کانالرودوپسین-۲<sup>۴</sup> را در سطح تمام سلولهای بدن خود بیان می کرد تولید نمایند. در این مدل نشان داده شد که تابش پالس های نور کوتاه بر روی قلب می تواند فعالیت نرمال قلبی را مختل نماید و با پالس های بلندتر نوری، قلب مدل موشی دچار آریتمی های کانونی می شد. انتقال ویروسی به سلولهای قلبی بالغ ژن پروتئین کانالرودوپسین-۲ منجر به افزایش حساسیت در این سلولها گردید. این افزایش حساسیت در سلولهای غیر تحریک پذیر نیز دیده شد. مدل‌های کامپیوتری اخیر نشان داد که عملکرد پروتئین کانالرودوپسین-۲ (یعنی حساسیت به ولتاژ و نور) و اثرات آن بر روی سیستم هدایتی و تحریکی انواع مختلفی از سلولهای قلبی (دهلیزی، بطنی و سیستم پورکینژ) و همچنین کل قلب دیده می شود.

استفاده از اپتوژنتیک در پژوهشهای قلب اولین بار در سال ۲۰۱۰ گزارش شد. در آن سال، اولین مدل موشی ترانس ژنتیک که پروتئین کانالرودوپسین-۲ را در قلب بیان می کرد، توسط بروگمن و همکاران معرفی شد (۱۵). در این نوع موشها، پالسهای نور آبی، پتانسیلهای عمل را در میوسیت‌های قلب فعال می کرد و اجازه می داد که قلب با تابش نور به دهلیز، بطن و یا دیواره بین بطنی به ضربان درآید در همان سال آرنبرگ<sup>۵</sup> و همکاران مدلی از ماهی<sup>۶</sup> را تولید کردند که پروتئین غشای کانالرودوپسین-۲ یا پروتئین غشایی NpHR (پمپ کلر فعال به نور) را در سطح سلولهای قلبی خود بیان می کرد به طوری که قلب می توانست به طور موقت با تابش نور آبی به ضربان بیفتد و یا با تابش نور نارنجی، ایست قلبی موقت ایجاد کرد (۱۶).

<sup>1</sup> Retinitis pigmentosa

<sup>2</sup> Bruegmann

<sup>3</sup> Transgenic

<sup>4</sup> Channelrhodopsin-2

<sup>5</sup> Arrenberg

<sup>6</sup> Zebrafish

مشابه به مطالعات انجام شده در حوزه علوم اعصاب، پروتئین های فلورسنت به منظور مطالعه دینامیک یون کلسیم و ولتاژ در سلولهای قلبی مورد استفاده قرار گرفته است. همچنین به منظور قابل مشاهده کردن تغییرات پیام رسان ثانویه انقباض و فعالیت آنزیمی نیز از این پروتئین ها نیز استفاده شده است (۱۷).

در سالهای اخیر تلاشهای زیادی برای ایجاد توانایی مدولاسیون تحریک پذیری سلولهای قلبی با استفاده از پروتئینهای حساس به نور انجام شده است. از اولین باری که با استفاده از پروتئین کانالرودوپسین-۲ اولین گزارش بر روی سلولهای قلبی منتشر شد تاکنون مطالعات زیادی در مدل‌های کشت سلول و بافت، ارگان خارج از بدن (ex-vivo) و یا بر روی مدل‌های حیوانی انجام شده است. همچنین مدل‌های کامپیوتری و شبیه سازی (in-silico) در حوزه اپتوژنیک و سلولهای قلبی انجام شده است. روش بیان پروتئین حساس به نور در سلولهای قلبی در سه حالت مختلف متمرکز شده است: (۱) استفاده از مدل‌های حیوانی ترانس ژن (که اولین مدلها بر روی مگس میوه، زرافیش و موش سوری انجام شده است). (۲) انتقال مستقیم ترانس ژن پروتئین پسین به سلولهای قلبی هدف. این رویکرد که نوعی ژن درمانی محسوب می شود با استفاده از وکتورهای ویروسی که بیشتر آنها آدنووایروسها می باشند. (۳) انتقال ژن به صورت غیرمستقیم با استفاده از پیوند سلولی. در این روش، سلولهای پیوند شده قبل از پیوند و در محیط خارج از بدن به صورت ژنتیکی بیان پروتئین حساس به نور امکان پذیر می شود. پس از پیوند، سلولهای مهندسی شده شامل فیبروبلاستها، سلولهای HEK و کاردیومیوسیتها می توانند به صورت الکتریکی با سلولهای قلبی میزبان پیوند شده و رفتارهای الکتریکی آنها را تحت تاثیر قرار دهد (۲۸-۳۰).

همانگونه که در بالا بدان اشاره شد بیشتر کارهای انجام شده در زمینه اپتوژنتیک در روی سلولهای قلبی کشت داده شده در محیط کشت می باشد. این مطالعات که اولین بار با استفاده از کانالرودوپسین-۲ انجام شد این امکان را فراهم کرد که با استفاده از فلاش های نور آبی عملکرد تحریکی سلولهای قلبی را تحت تاثیر قرار داد. آبلیز<sup>۱</sup> با استفاده از انتقال<sup>۲</sup> لنتی<sup>۳</sup> ویروس توانست بر روی غشای سلولهای قلبی مشتق شده از سلولهای بنیادی جنینی (hESC-CMs) انتقال داده و به صورت موقت ضربان سازی با استفاده از نور انجام دهد.

یکی از پتانسیلهای مهم اپتوژنتیک در قلب، توسعه ضربان سازهای نوری به جای ضربان سازهای الکتریکی است. روش ضربان ساز نوری<sup>۴</sup> با روش ژنتیک نوری در مقایسه با ضربان سازهای الکتریکی، در شرایط زیر می تواند کمک کننده باشد (۱۰).

<sup>1</sup> Ablize

<sup>2</sup> Transduction

<sup>3</sup> Lenti virus

<sup>4</sup> Optical pacemaker

۱) در اهداف ایجاد ضربان با انرژی پایین می توان، ضربان ساز نوری به الکتریکی مزیت دارد. به طور اختصاصی، تحریک نوری نیز می تواند با توجه به ساختار سیستم هدایتی هدفمند صورت گیرد. به طور مثال تحریک باندلهای قلبی<sup>۱</sup> و ضربان سازی با قدرت انرژی پایین به روش تحریک نوری می تواند موثرتر از تحریک الکتریکی باشد. میزان ضربان سازی ضربان سازهای خود قلب (یعنی گره سینوسی-دهلیزی<sup>۲</sup> و دهلیزی بطنی<sup>۳</sup>) می تواند توسط نور به صورت انتخابی تحت تاثیر قرار گیرد (۱۱).

۲) درک نقش انواع سلولهای اختصاصی و ساختارها در القا، نگهداری و اتمام آریتمی های قلبی این امکان را بدست می دهد که با استفاده از فناوری مبتنی بر نور (اپتوژنتیک) فعال سازی یا مهار انتخابی بخشهای ایجاد کننده ضربانهای الکتریکی تحت تاثیر قرار گیرد. به طول مثال سیستم فیبرهای پورکینژ<sup>۴</sup> که نقش مهمی در حوادث پیش آریتمی و یا در القاء فیبریلاسیون بطنی<sup>۵</sup> و یا حداقل در مراحل انتهایی فیبریلاسیون دهلیزی<sup>۶</sup> بر عهده دارد، با مهار یا فعال کردن دینامیکی و انتخابی در مدلهای تجربی، نگرش جدیدی در خصوص درمان این نوع آریتمی های مرگبار بدست داده است. این سیستمها به صورت انتخابی و هدفمند، با استفاده از ضربان سازهای الکتریکی قابل دسترس نیستند.

۳) تداخلات عصبی-قلبی می تواند با استفاده از خروجی های سمپاتیک یا پاراسمپاتیک<sup>۷</sup> و تحریک آنها توسط نور، می تواند در کنترل عملکرد ضربانی قلب نقش داشته باشد. با استفاده از تحریک الکتریکی یا شیمیایی امکان تفکیک فضایی یا مکانی این دو بخش وجود ندارد. استفاده از روش اپتوژنتیک، به عنوان یک ابزار جدید برای جداسازی تداخلات عصبی و قلبی موثر خواهد بود.

۴) اپتوژنتیک این امکان را فراهم می سازد که سلولهای غیرتحریک پذیر همچون فیبروبلاستها را در ارتباط با سلولهای قلبی از نظر بهبود عملکرد مورد استفاده قرار گیرد. به عبارت دیگر استفاده سلولهای فیبروبلاست که کانالوردوپسین در سطح آنها بیان شده است می تواند برای درمان بیماریهای قلبی یا آریتمی های قلبی استفاده کرد (۱۳-۱۴).

---

<sup>1</sup> Cardiac bundle

<sup>2</sup> Sinoatrial node

<sup>3</sup> Atrioventricular node

<sup>4</sup> Purkinje fibers

<sup>5</sup> Ventricular fibrillation

<sup>6</sup> Arterial fibrillation

<sup>7</sup> sympathetic and parasympathetic

فصل سوم

اهداف



## هدف کلی

ایجاد دانش فنی کنترل عملکرد سلولهای قلبی بر اساس ژنتیک نوری (اپتوژنتیک) در مدل آزمایشگاهی

## اهداف ویژه

- (۱) ایزوله و کشت سلولهای قلبی موش صحرایی در محیط آزمایشگاهی
- (۲) تعیین بیان ژن کانالورودپسین-۲ در سلولهای قلبی موش صحرایی پس از ترانسفکشن
- (۳) تعیین بیان پروتئین کانالورودپسین-۲ در سلولهای قلبی موش صحرایی پس از ترانسفکشن
- (۴) تعیین و مقایسه غلظت کلسیم داخل سلولی پس از تابش نور در سلولهای قلبی مهندسی شده ژنتیک نوری در مقایسه با سلولهای شاهد

## سوالات یا فرضیات پژوهشی

- (۱) آیا امکان ایزوله کردن و کشت سلولهای قلبی موش صحرایی در محیط آزمایشگاهی با عملکرد انقباضی وجود دارد؟
- (۲) بیان ژن کانالورودپسین-۲ در سلولهای قلبی موش صحرایی پس از ترانسفکشن چگونه است؟
- (۳) بیان پروتئین کانالورودپسین-۲ در سلولهای قلبی موش صحرایی پس از ترانسفکشن چگونه است؟
- (۴) غلظت کلسیم داخل سلولی پس از تابش نور در سلولهای قلبی مهندسی شده ژنتیک نوری در مقایسه با سلولهای شاهد متفاوت است.

فصل چهارم  
روش پژوهش

## ۱-۴- جداسازی و کشت سلول های کاردیومیوسیت

برای آماده سازی مدل حیوانی، از نوزاد موش صحرایی یا رت استفاده شد. بدین صورت که پس از بیهوشی با کلروفورم و خروج قلب، بافت قلب با محلول شستشو شامل ۲۰ mM HEPES ، ۱ mM  $H_2NaPO_4$  ، ۵/۴ mM KCl ، ۱۲۰ mM NaCl ، ۵/۵ mM گلوکز و ۰/۸ mM  $MgSO_4$  در pH ۷/۴-۷/۳ شستشو داده و سپس با استفاده از اسکالپل بافت قلب را به ساطوره کرده و به قطعات ریز تقسیم می گردد. سپس با محلول ۰/۱۶ mg/ml هپارین مجدداً دوبار شستشو داده و با استفاده از سانتریفیوژ (۱۵۰۰ دور در دقیقه به مدت ۲ دقیقه) محلول هپارین را خارج می کنیم. سپس مجدد با محلول شستشو، قطعات ریز بافتی شستشو می شود و در نهایت برای هضم آنزیمی، قطعات بافتی با محلول ۰/۲ درصد تریپسین به مدت بیست دقیقه در دمای  $37^{\circ}C$  بر روی استیرر انکوبه می شود. پس از بیست دقیقه محیط رویی خارج و با استفاده از محیط DMEM حاوی ده درصد FBS، تریپسین غیرفعال می گردد. این مرحله ۵ بار تکرار می شود و هر بار تریپسین محیط رویی توسط محیط سرم دار غیرفعال و نهایتاً مجموع محیطهای جمع آوری شده را با ۱۲۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ کرده و رسوب سلولی را در پتری یا فلاسک حاوی محیط DMEM حاوی ۱۵ درصد سرم FBS، ۱ درصد L-glutamin کشت داده می شود. به منظور جداسازی فیبروبلاستها از سلولهای کاردیومیوسیت، پس از ۱/۵ الی ۲ ساعت محیط رویی را جمع آوری و مجدداً سانتریفیوژ می گردد. سپس رسوب حاصله به فلاسکی که قبلاً با ژلاتین ۰/۰۱ درصد پوشش داده شده، انتقال داده می شود. پس از ۷۲ ساعت انکوباسیون، محیط رویی تعویض می گردد.

## ۲-۴- تعیین هویت سلولهای کاردیومیوسیت جداسازی شده به روش وسترن بلات

برای تعیین هویت رده سلولی کاردیومیوسیت جدا شده از آنتی بادی  $\alpha$ -actinin به روش وسترن بلات استفاده شد. وسترن بلاتینگ شامل جداسازی مخلوط پروتئینی بر روی ژل و سپس انتقال آن‌ها به یک غشای مناسب است. سپس پروتئینها از طریق میانکنش با یک آنتی بادی اختصاصی نشاندار، شناسایی می شود. در ابتدا با استفاده از تریپسین سلولهای کاردیومیوسیت کشت داده شده از کف فلاسک جدا و با استفاده از سانتریفیوژ (۱۲۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه) رسوب سلولی حاصل می شود. سپس به رسوب حاصله ۲۰۰  $\mu L$  بافر لیز کننده RIPA اضافه کرده تا دیواره سلول شکسته شود. بلافاصله ۱۰  $\mu L$  مهار کننده پروتئاز به ویال رسوب سلولی اضافه کرده و پس از ۳۰ ثانیه ورتکس، ده دقیقه روی یخ نگهداری می شود. این کار ۵ بار تکرار می شود. سپس با دور ۱۲۰۰۰ به مدت ده دقیقه سانتریفیوژ می کنیم. رسوب حاصله را دور ریخته و مایع رویی در دمای ۲۰- نگهداری می شود. بدین روش محصولات پروتئینی استخراج می گردد.

برای تعیین غلظت محصولات پروتئینی استخراج شده از روش برادفورد استفاده می شود. بدین صورت که  $225 \mu\text{L}$  از محلول برادفورد ( $0.05 \text{ gr}$  کماسی بلو به همراه  $25 \text{ mL}$  اتانول  $96\%$  و  $5 \text{ mL}$  فسفریک اسید  $85\%$  با  $50 \text{ cc}$  آب دیونیزه حل می شود) به همراه  $25 \mu\text{L}$  از پروتئین استخراج شده را در چاهک پلیت ۹۶ خانه می ریزیم. چاهک شاهد شامل  $225 \mu\text{L}$  از محلول برادفورد به همراه  $25 \mu\text{L}$  آب دیونیزه بود. پس از ۵ دقیقه انکوباسیون در تاریکی، جذب محیط را در  $595 \text{ nm}$  یا  $600 \text{ nm}$  خوانده و با استفاده از منحنی استاندارد غلظت محصولات پروتئینی تعیین شد. سپس با توجه به غلظت محصولات پروتئینی بدست آمد بافر نمونه (Sample Buffer) با نسبت چهار (نمونه محصولات پروتئینی) به یک (SDS) تهیه شد. بافر نمونه به مدت ۵ دقیقه داخل آب جوش (دمای  $100^\circ \text{C}$ ) انکوبه شده تا پروتئینها از هم باز شده و SDS به پچهای هیدروفوب آن متصل شود. سپس داخل هر چاهک ژل وسترن  $20 \mu\text{L}$  از بافر نمونه ریخته می شود. الکتروفورز عمودی در ژل پلی اکریل آمید با استفاده از سیستم ناپیوسته انجام شد. بدین ترتیب که ژل جداکننده ۱۲ درصد و ژل متراکم کننده ۵ درصد استفاده شد.

برای کنترل منفی از محصولات پروتئینی استخراج شده از سه رده سلولی HUVEC، MCF-7 و فیبروبلاست انسانی استفاده شد. برای کنترل مثبت، از بافت قلب نوزاد موش صحرائی استفاده شد. برای این مورد، بافت قلب جدا، پس از شستشو و اضافه کردن بافر لیز کننده RIPA و افزودن مهار کننده پروتئاز، استخراج محصولات پروتئینی مطابق روش بالا انجام شد. تانک الکتروفورز به منبع تغذیه وصل شده و دستگاه روی ولتاژ  $100 \text{ V}$  تنظیم گردید. پس از گذشت زمان لازم (در حدود ۲ ساعت)، باندهای پروتئینی بر روی ژل تفکیک می شود. برای مشخص شدن باندها، ژل با استفاده از کماسی بلو رنگ آمیزی شد. پس از رنگ آمیزی ژل، رنگ بری با استفاده از محلول اسید استیک، متانول و آب مقطر با نسبت ۱، ۳ و ۶ جهت واضح تر شدن باندها به مدت ۲۰ دقیقه انجام شد.

برای انجام وسترن بلات ابتدا طبق روند قبلی ژل SDS انجام می شود ولی این بار رنگ آمیزی صورت نمی گیرد تا در ادامه مراحل بلاتینگ انجام گردد. پروتئینها بر روی ژل SDS-PAGE بر اساس اندازه تفکیک می شوند. پروتئینهای تفکیک شده بر روی ژل در ولتاژ  $100$  ولت به مدت ۲ ساعت به کاغذ نیتروسولوز بصورت پیوسته و مرطوب منتقل می شود. بدین منظور ابتدا مقداری از بافر انتقال (شامل  $6 \text{ gr}$  Tris-base،  $28/8 \text{ gr}$  گرم گلیسین و  $300 \text{ mL}$  متانول که با آب مقطر به دو لیتر رسانده می شود) را در یک ظرف تمیز ریخته و ژل را پس از بریدن بخش متراکم کننده آن حداقل ۱۰ دقیقه در بافر قرار داده می شود. با کمک پنس ۱ کاغذ نیتروسولوز و چندین کاغذ صافی را دقیقاً هم اندازه ژل برش می زنیم. دو عدد اسفنج را که قرار است در طرفین غشا و ژل قرار بگیرند را در بافر انتقال قرار داده تا کاملاً خیس شده و سپس اجزای فوق را رو هم قرار داده شد. کاغذهای صافی به تعداد مساوی به همراه یک اسفنج را در دو طرف غشا و ژل قرار داده و نهایتاً ساندویچ بلات را در قاب

پلاستیکی مربوطه محکم کرده و در تانک بلات که تا ارتفاع مناسب با بافر انتقال پر شده است، قرار داده شد. در این مرحله تانک وسترن بلاتینگ در مخزنی از یخ قرار گرفته تا گرمای ناشی از جریان، در پروسه انتقال خلی ایجاد نکند. سپس کاغذ نیتروسولوز در محلول بلاکر به مدت ۱۶ ساعت قرار داده و ۳ بار و هر بار ۵ دقیقه شستشو با محلول بافر TBST (شامل ۰/۸۷۶ g NaCl، ۰/۳۱۵ Tris HCl، ۵۰ mL tween 20 با آب دیونیزه به حجم ۱۰۰ mL رسانده می شود) حاوی ۳ گرم BSA (۳ درصد) شبانه (overnight) انکوبه شد. در مرحله بعدی ۲ ساعت با محلول TBST خالی بدون BSA شستشو داده شد. سپس ۱۰  $\mu\text{L}$  از آنتی بادی اولیه  $\alpha$ -actinin در ۱۰ mL محلول TBST حل کرده و روی غشای نیتروسولوزی ریخته شد و مجدداً ۲ ساعت روی شیکر در دمای اتاق قرار داده شد. پس از آن مجدداً ۱۰ دقیقه با محلول TBST شستشو داده شد. این کار برای شستن آنتی بادی های اتصال نیافته ۴ الی ۵ بار انجام شد. پس از خارج کردن آنتی بادی اولیه، ۵  $\mu\text{L}$  آنتی بادی ثانویه Horseradish peroxidase یا HRP به همراه ۱۰ mL محلول TBST را به مدت حداکثر ۲ ساعت بر روی شیکر در دمای اتاق قرار می دهیم. در نهایت با استفاده از تکنیک ECL که شامل ماده لومینسانس است، پروتئین مورد نظر شناسایی گردید.

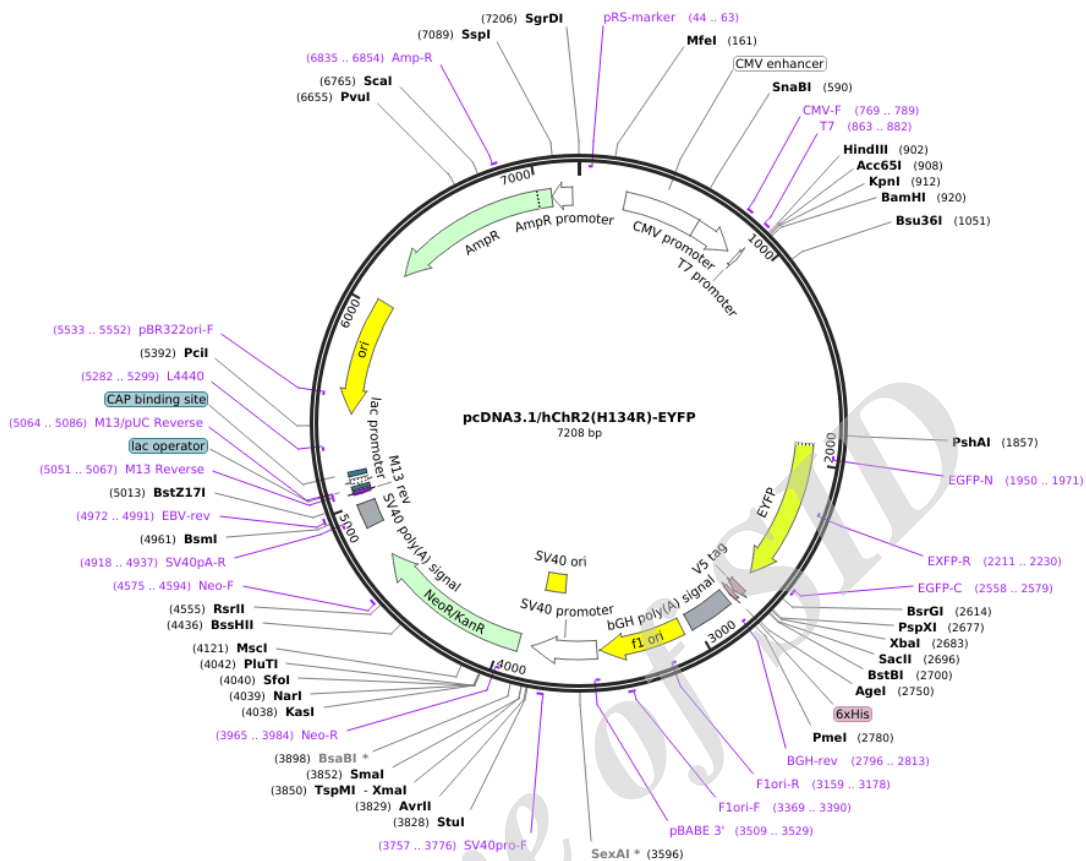
### ۳-۴- تهیه وکتور کانالروپسین-۲<sup>۱</sup>

ابتدا وکتور حامل ژن کانالروپسین ۲ در سویه DH5- $\alpha$  باکتری E-coli از شرکت addgene توسط همکار اهل کشور چین خریداری و وارد کشور گردید. با توجه به تحریم ایران از سوی این شرکت، امکان خرید مستقیم وجود نداشت. نقشه ژنی وکتور فوق در شکل ۴-۱ آورده شده است. سپس باکتری در محیط LB مایع حاوی ۱۰۰  $\mu\text{g/ml}$  آنتی بیوتیک آمپی سیلین تکثیر شد. پس از انتقال به محیط جامد و رشد کلونی، باکتریها در گلیسرول و محیط LB منجمد و در دمای  $70^{\circ}\text{C}$ - نگهداری شد.

### ۴-۴- استخراج پلاسمید و تعیین هویت آن به روش PCR

استخراج پلاسمید با استفاده از کیت استخراج پلاسمید شرکت سیناکلون GF-1 Plasmid DNA extraction Kit انجام شد. در ابتدا، باکتری DH5- $\alpha$  حاوی وکتور در محیط LB به همراه آنتی بیوتیک آمپی سیلین به صورت ۱۸-۱۲ ساعت در شیکر

<sup>1</sup> Channelrhodopsin



شکل 4-1- نقشه ژنی وکتور حامل ژن کانالروودوپسین ۲ در سویه باکتری E-coli DH5- $\alpha$  از شرکت addgene

انکوباتور با دور ۱۸۰ rpm در دمای ۳۷°C انکوبه شد. پس از کدورت محیط ناشی از رشد باکتری، به مدت ۵ دقیقه در دور ۶۰۰۰ سانتریفیوژ انجام شد. سپس ۲۵۰  $\mu$ L از محلول S1 کیت، به رسوب باکتری افزوده و به طور کامل ورتکس شد. سوسپانسیون حاصل را به یک میکروتیوب ۱/۵ mL جدید منتقل کرده و ۲۵۰  $\mu$ L از محلول S2 کیت به سوسپانسیون اضافه کرده و به طور آرام تا زمان بدست آمدن یک محلول یکنواخت شفاف تکان داده شد. بهتر است که این مرحله بر روی یخ حداکثر به مدت ۵ دقیقه انجام شود. برای خنثی کردن لیز کننده، ۴۰۰  $\mu$ L از بافر خنثی کننده کیت (NB) به آن افزوده و مجدداً به آرامی تا بدست آمدن یک رسوب سفید رنگ تکان داده شد. در نهایت در دور ۱۶۰۰-۱۴۰۰ در ده دقیقه سانتریفیوژ می شود. در مرحله بعدی محلول رویی را به ستونهای موجود در کیت انتقال داده و به مدت ۱۰۰۰۰ g برای یک دقیقه سانتریفیوژ و محلول زیری دور ریخته می شود. ستون را با ۷۰۰  $\mu$ L از محلول شستشو در ۱۰۰۰۰ g به مدت یک دقیقه سانتریفیوژ نموده و مجدد محلول زیر خارج شد. دوباره با دور ۱۰۰۰۰ g سانتریفیوژ کرده تا اتانول اضافی از محیط خارج شود. در مرحله آخر،

ستون را در یک میکروتیوب تمیز قرار داده و با افزودن  $60 \mu\text{L}$  از بافر Elution ستون شستشو داده و مجدد در  $10000 \text{ g}$  به مدت یک دقیقه سانتریفوژ شد. پس از خارج کردن ستون، محتویات ویال در دمای  $4$  تا  $20$ - درجه نگهداری می شود.

#### ۴-۵- طراحی آغازگرها<sup>۱</sup> و تکثیر ناحیه ژنی مورد نظر

برای مشخص نمودن حضور ژن کانالورودپسین در پلاسیمید از روش PCR و ژل-الکتروفورز استفاده شد. در ابتدا آغازگر مستقیم<sup>۲</sup> و معکوس<sup>۳</sup> بر اساس نقشه ژنی به شکل زیر طراحی و جهت ساخت به شرکت پیشگام سفارش داده شد.

Forward	AATGGGCGGTAGGCCGTGTAC
Reverse	ACCGAGGAGAGGGTTAGGGATAG

برای انجام PCR، در ابتدا  $5 \mu\text{L}$  master mix،  $0.5 \mu\text{L}$  آغازگر مستقیم و  $0.5 \mu\text{L}$  آغازگر معکوس،  $1 \mu\text{L}$  از نمونه پلاسیمید استخراج شده و  $3 \mu\text{L}$  آب مقطر را مخلوط و با برنامه زیر در دستگاه ترموسایکلر برای  $35$  سیکل قرار داده شد.

دما	$94^\circ\text{C}$	$94^\circ\text{C}$	$65^\circ\text{C}$	$72^\circ\text{C}$	$72^\circ\text{C}$
زمان	۵ دقیقه	۳۰ ثانیه	۳۰-۴۰ ثانیه	۲۰ ثانیه	۵ دقیقه

پس از تهیه ژل آگاروز  $1\%$  درصد، محصول  $3 \mu\text{L}$  از محصول PCR به همراه  $1 \mu\text{L}$  از loading buffer (شامل گلیسرول  $60\%$ ،  $10 \text{ mM}$  Tris-HCl،  $0.3\%$ ، رنگ برموفنل بلو و رنگ xylene cyanol FF) را مخلوط کرده و به چاهک ژل آگاروز انتقال داده شد. برای کنترل هم  $1 \mu\text{L}$  محلول حاوی Ladder را به کنترل اضافه شد. سپس در برای الکتروفورز، از ولتاژ  $V$   $120$  به مدت  $30-60$  دقیقه انجام شد. پس از انجام الکتروفورز، به منظور تایید قطعه ژنی کانالورودپسین خریداری شده، قطعه مورد نظر بر روی ژل برش داده شده و جهت تعیین توالی به شرکت پیشگام ارسال شد. توالی بدست آمده به روش توالی یابی سنگر<sup>۴</sup>، با توالی های موجود در پایگاه اطلاعاتی NCBI با استفاده از برنامه BLAST مقایسه گردید.

<sup>1</sup> Primer

<sup>2</sup> Forward

<sup>3</sup> Reverse

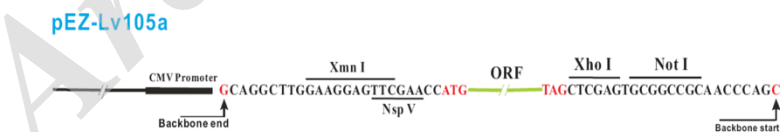
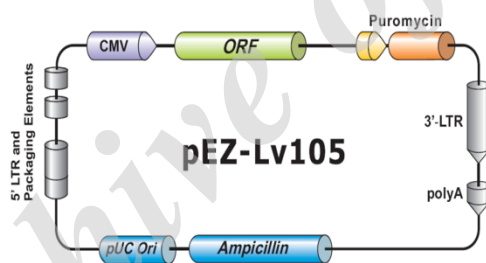
<sup>4</sup> Sanger Sequencing

## ۴-۶- تولید لنتی ویروس غیر الحاقی نو ترکیب حاوی ژن Chr2 در سلولهای HEK 239T

برای تولید ویروس جهت ترنسفکشن ژن مورد نظر، از سه پلاسمید یا ناقل ویروسی انتقالی<sup>۱</sup>، بسته بندی<sup>۲</sup> و پوششی<sup>۳</sup> استفاده شد. در این مطالعه از لنتی ویروس های نسل دوم استفاده شد که مشخصات و توالی ژن های آنها به صورت زیر می باشد.

### ۴-۶-۱- ناقل انتقالی (pEZ-LV105)

از آنجاییکه ناقل ژن کانالروپوسین به صورت pcDNA3.1 می باشد لذا آغازگری طراحی شد که حاوی توالی مکمل جایگاه برش موجود در ناحیه ORF ناقل انتقال (XmnI سمت ۵' و Not I سمت ۳') باشد. شکل ۵-۸ توالی ژن ها و محل قرارگیری آنها را در ناقل انتقالی نشان می دهد. پس از طراحی آغازگر مورد نظر، قطعه ژنی مورد نظر با PCR تکثیر شده و بر روی ژل آگارز مورد بررسی قرار می گیرد.



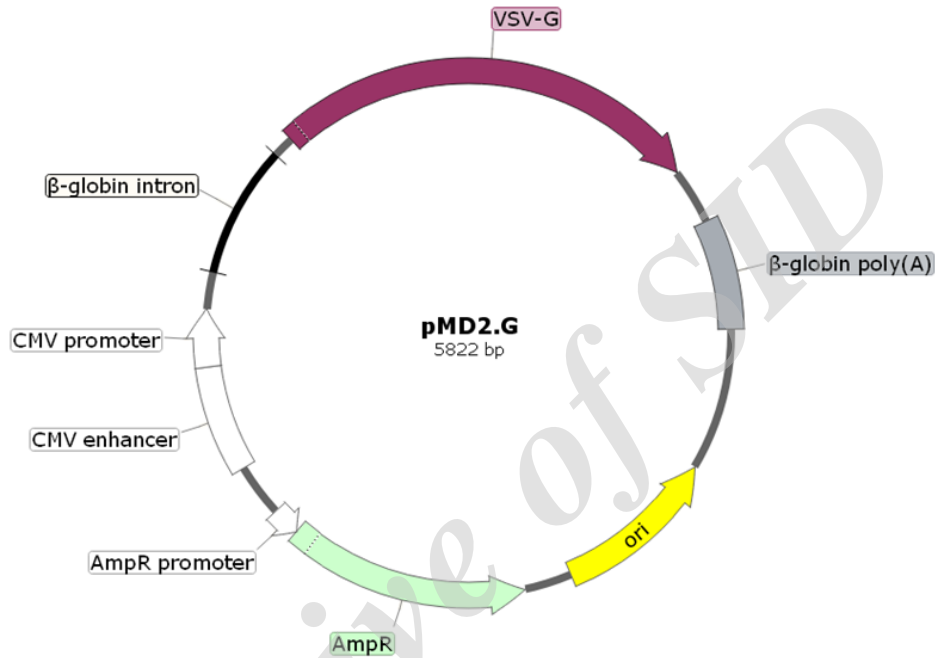
شکل ۴-۲- توالی ژن ها و محل قرارگیری آنها را در ناقل انتقالی (Transfer)

<sup>1</sup> Transfer  
<sup>2</sup> Packaging  
<sup>3</sup> Envelope



## ۲-۶-۴- ناقل بسته بندی pMD2.G

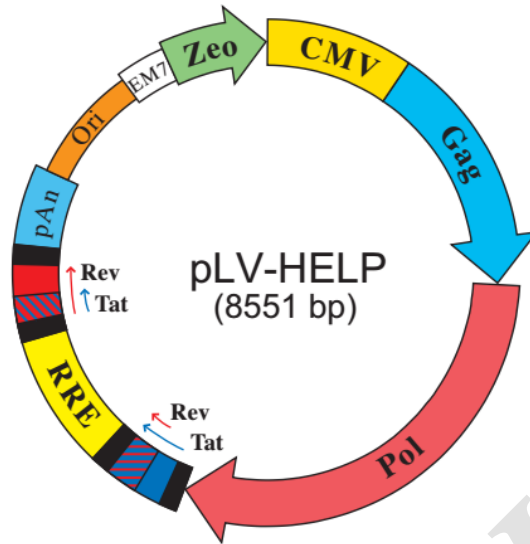
این ناقل حامل ژن گلیکوپروتئینی پوشش ویروس Vesicular stomatitis Indiana virus (VSVG) و پرموتور CMV می باشد. ژن VSVG از طریق اتصال به گیرنده غشایی خود، اتصال ویروس به سلول را تسهیل می کند. شکل ۵-۹ توالی ژن ها و محل قرارگیری آنها را در ناقل بسته بندی نشان می دهد.



شکل ۴-۳- توالی ژن ها و محل قرارگیری آنها را در ناقل بسته بندی

## ۳-۶-۴- ناقل پوششی PLV-HELP

این ناقل دارای توالی های gag, pol, rev و RRE می باشد که توالی gag مسئول ساخت پروتئین های کپسید و توالی pol مسئول ساخت آنزیم های همانند سازی می باشد. توالی Rev برای بیان پروتئین های ساختمانی ویروس، ضروری است و توالی Rev. خروج نسخه های ویروسی برش نخورده را از هسته سلول، تسهیل می کند. شکل ۵-۱۰ نقشه ژنی و ترتیب قرارگیری آنها را نشان می دهد.



شکل ۴-۴- توالی ژن ها و محل فرارگیری آنها را در ناقل pLV-HELP

Archive of SID

#### ۷-۴- انتقال ناقل کلون شده به سویه باکتریایی و غربال کردن کلونهای حاوی پلاسمید نوترکیب

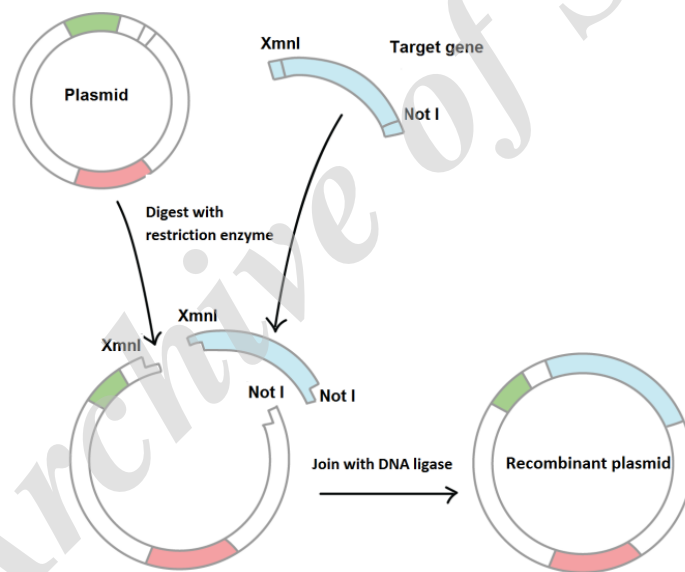
در این مرحله از باکتری E-coli Top10 استفاده شد. مستعد کردن<sup>۱</sup> باکتریها از روش شیمیایی استفاده شد. در این روش پس از کشت باکتریها در محیط کشت LB مایع به صورت شبانه و رشد باکتری و کدورت کافی محیط کشت (OD بین ۰/۷-۰/۵)، باکتریها پس از سانتریفیوژ در دور RPM ۵۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه و دمای ۴ درجه جمع آوری و سپس در کلرید مننزیوم ۵۰ میلی مولار به مدت ۱۵ دقیقه بر روی یخ قرار داده شد. سپس پس از سانتریفیوژ مجدد، ۱۰۰ میلی مولار کلرید کلسیم سرد و استریل به رسوب حاصله اضافه کرده و پس از انکوباسیون ۲۰ دقیقه بر روی یخ، مجدداً سانتریفیوژ انجام شود. در نهایت رسوب حاصله در کلرید کلسیم حاوی ۲۰ درصد گلیسرول ذخیره می شد. به منظور ترانسفورماسیون کردن ناقل ویروس ها به باکتریهای مستعد ابتدا ناقل آماده شده را به باکتریهای مستعد افزوده می شود. پس از ۳۰ دقیقه شوک سرما و حرارتی، محیط کشت بدان افزوده و در دمای ۳۷ درجه انکوبه شد. به منظور اتصال قطعه ژنی مورد نظر و ناقل انتقالی، پس از ایجاد قطعات برشی پس از هضم آنزیمی، قطعات از روی ژل بازیابی شده و به همراه آنزیم T4 ligase و بافر آنزیمی در دمای ۱۶ درجه به مدت ۱۲ الی ۱۶ ساعت انکوبه گردید. پس از دریافت ناقل نوترکیب، سلولها روی پلیت آگار حاوی آمپی سیلین کشت داده شدند و به مدت یک شب در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه شدند. محیط کشت حاوی آنتی بیوتیک آمپی سیلین امکان رشد را تنها برای باکتریهای فراهم میکند که پلاسمید نوترکیب حامل ژن مقاومت به آمپی سیلین را دریافت کرده اند.

<sup>1</sup> Competent Cell

## ۸-۴- کلونی PCR، برش آنزیمی و تعیین توالی مستقیم DNA

کلونی های منفرد روی پلیت بهطور مجزا برداشته شد و در ۵ میلیلیتر محیط LB مایع حاوی آنتیبیوتیک کشت داده و در انکوباتور شیکردار در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد قرار داده شدند. پس از کمتر از ۱۶ ساعت، استخراج پلاسمید از باکتریهای کشت داده شده انجام شد. در صورتی که قطعه ژنی مورد نظر در پلاسمید نوترکیب حضور داشته باشد، این قطعه ژنی

با آغازگرهای همسانه سازی قابل تکثیر است، بنابراین روی پلاسمیدهای استخراج شده واکنش PCR با آغازگرهای همسانه سازی انجام شد تا در صورتی که باند مربوط مشاهده شود دلیلی بر حضور قطعه باشد. همچنین از برش آنزیمی پلاسمید استخراج شده توسط آنزیمهای محدود کننده Xmn1 و Not 1 و سپس الکتروفورز روی ژل آگارز به منظور تشخیص کلون مثبت (حاوی پلاسمید نوترکیب) از کلون منفی (فاقد پلاسمید نوترکیب) نیز استفاده شد.



شکل ۴-۵- نحوه هضم ژن کانالروپسین در ناقل (پلاسمید) انتقالی

## ۹-۴- تولید و تغلیظ ویروس و آماده سازی سلولهای هدف کاردیومیوسیت

### ۱-۹-۴- کشت و آماده سازی سلولهای HEK-239T

سلولهای HEK-239T در محیط کشت DMEM حاوی ۱۰ درصد سرم در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه و پس از

تراکم حدود ۷۰ الی ۸۰ درصد جهت انجام ساخت ویروس آماده شدند.

## ۲-۹-۴- آلوده سازی سلولهای HEK-239T، ساخت و تغلیظ ویروس

برای تولید لنتی ویروسهای نوترکیب و فعال، سلولهای مولد ویروس را همزمان با سه ناقل لنتی ویروسی ترانسفر، بسته بندی و پوششی با روش رسوب DNA-فسفات کلسیم ترانسفکت شد. پس از تهیه رسوب مطلوب، به آرامی و قطره قطره به محیط سلولهای HEK-239T اضافه می شد. سلولهای به مدت ۱۴ ساعت انکوبه و سپس محیط آنها با محیط جدید تعویض شد. پس از این مراحل سلولها تا زمان تولید ویروس و رها سازی آن به محیط کشت انکوبه شدند. پس از ۲۴ ساعت محیط رویی جمع آوری شده و با عبور دادن از ستون، تغلیظ ویروس انجام شد. به منظور تایید بیان پروتئین غشایی کانالرودوپسین در سلولهای HEK-239T میزان بیان پروتئین گزارشگر GFP، سلولهای آلوده شده زیر میکروسکوپ فلورسنت مشاهده شدند.

## ۳-۹-۴- آلوده سازی سلولهای کاردیومیوسیت

آلوده سازی با استفاده از لنتی ویروسهای نوترکیب کانالرودوپسین در سلولهای کاردیومیوسیت نوزاد موش صحرایی که به روش ۴-۱ بدست آمده است در حالتی که تراکم سلولی ۷۰ درصد را داشتند انجام شد. پس از ۴۸ ساعت، به منظور تعیین بیان پروتئین غشایی کانالرودوپسین در سطح غشای سلولهای کاردیومیوسیت، با استفاده از پروتئین گزارشگر GFP و مشاهده آن در زیر میکروسکوپ فلورسنت بررسی شد.

## ۴-۱۰- تعیین غلظت یون کلسیم داخل سلولی کاردیومیوسیت

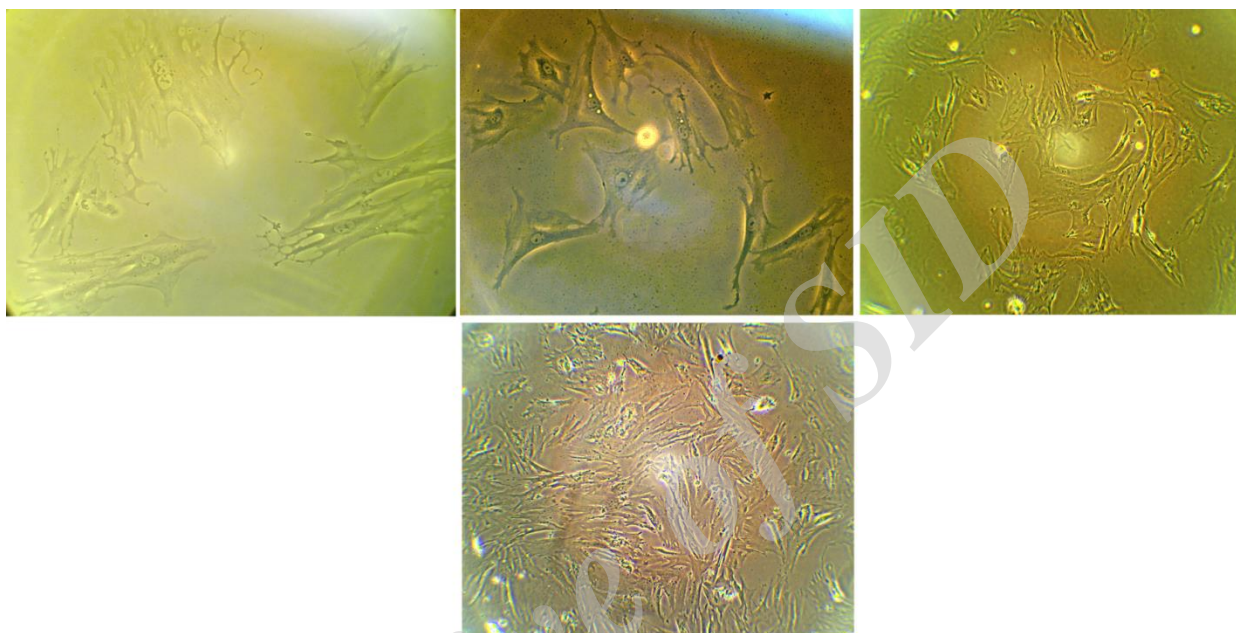
به منظور بررسی یون کلسیم داخل سلولی در سلولهای کاردیومیوسیت نوزاد موش صحرایی از روش برگوس<sup>۱</sup> و همکاران استفاده شد. به طور خلاصه، سلولهای کاردیومیوسیت بر روی پلیتهای ۹۶ چاهکی با تراکم ۸۰ درصد کشت داده شدند. پس از ۲۴ ساعت محیط رویی خارج و دو بار با بافر نرمال سالین شستشو داده شدند. پس از آن انکوباسیون با رنگ Fura-2- acetoxymethyl ester به مدت یک ساعت انجام شد. پس از خارج کردن رنگ و شستشوی مجدد توسط بافر نرمال سالین پلیت مورد نظر توسط دستگاه H4 Plate Reader مورد بررسی قرار می گیرد. در این حالت شدت با برانگیختن در طول موج ۳۴۰ نانومتر و ۳۸۰ نانومتر نشر ۵۱۰ نانومتر ثبت و اندازه گیری شد.

<sup>1</sup> Burgos 2007

فصل پنجم  
یافته های پژوهش

## ۱-۵- جداسازی و کشت سلول های کاردیومیوسیت

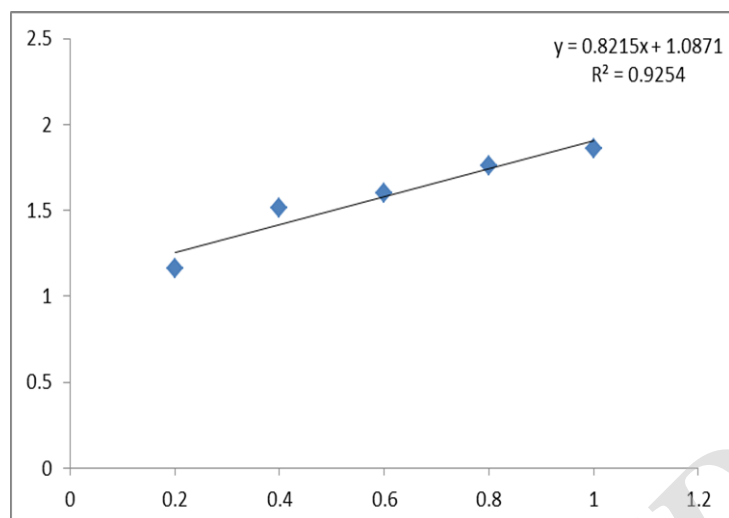
در شکل ۱-۵ شکل ظاهری سلولهای کاردیومیوسیت نوزاد موش صحرایی استخراج شده در کشت تک لایه نشان داده شده است.



شکل ۱-۵- شکل ظاهری سلولهای کاردیومیوسیت نوزاد موش صحرایی جدا شده در کشت تک لایه

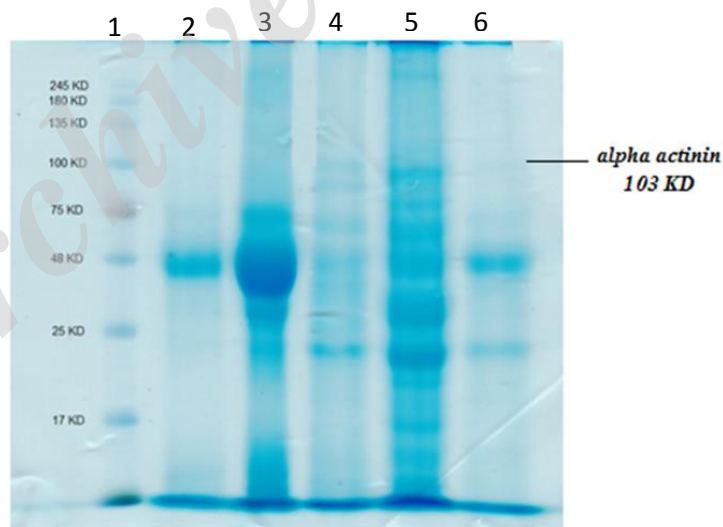
## ۲-۵- تعیین هویت سلولهای کاردیومیوسیت جداسازی شده به روش وسترن بلات

برای بررسی مارکرهای پروتئینی ابتدا لازم است غلظت محصولات پروتئینی توسط آزمون برادفورد سنجیده شود. در شکل ۲-۵ منحنی جذب استاندارد پروتئین BSA نشان داده شده است. بر اساس این منحنی و معادله خط بدست آمده غلظت محصولات پروتئینی مورد نظر تعیین شد.



شکل ۵-۲- منحنی استاندارد BSA جهت انجام آزمون برادفورد

در شکل ۵-۳ تصویر SDS-page محصولات پروتئینی استخراج شده از سلولهای کاردیومیوسیت آورده شده است. همانگونه که مشاهده می شود باند پروتئین  $\alpha$ -actinin مارکر اختصاصی سلولهای کاردیومیوسیت در چاهک شماره ۶ با وزن مولکولی ۱۰۳ کیلوالتون مشاهده می شود.



شکل ۵-۳- تصویر SDS page پروتئین استخراج شده. چاهک ۱: مارکر پروتئین 11-242KDa (محصول شرکت sinaclo) - چاهک ۲-۴: نمونه کنترل منفی (نمونه پروتئین استخراج شده از سلولهای MCF-7, HUVEC, و فیبروبلاست) - چاهک ۵: نمونه کنترل مثبت (نمونه پروتئین جداسازی شده از بافت قلب موش صحرائی) چاهک ۶: نمونه پروتئین استخراج شده از سلولهای کاردیومیوسیت جداسازی شده از قلب موش صحرائی -



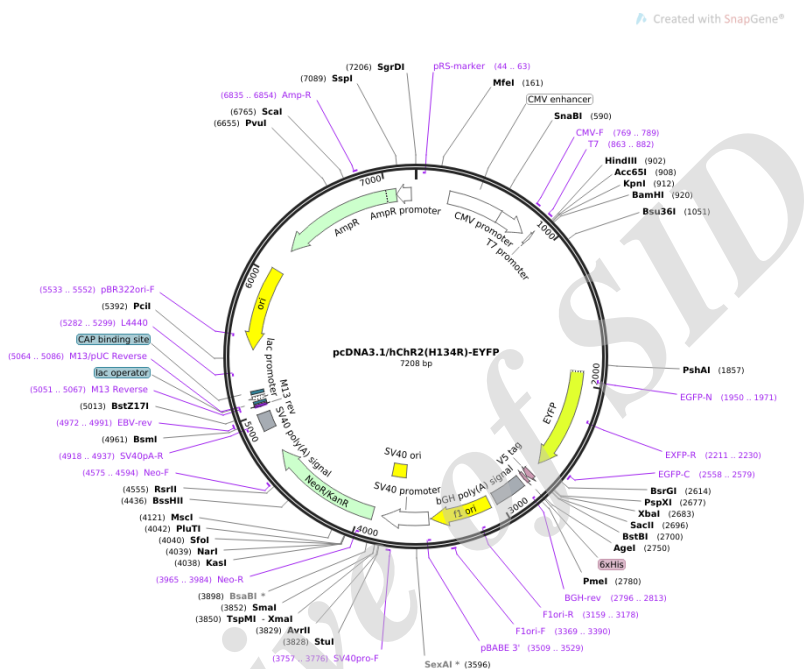
در شکل ۴-۵ تصویر رادیوگرافی حاصل از روش ECL آورده شده است. باندهای شماره ۵ و ۸ مربوط به نمونه پروتئین استخراج شده از سلولهای کاردیومیوسیت نوزاد موش صحرائی است. باندهای ۶ و ۷ نیز نمونه پروتئین جداسازی شده از بافت قلب نوزاد موش صحرائی است. همانگونه که مشاهده می شود پروتئین اختصاصی  $\alpha$ -actinin به خوبی در رده سلولی استخراج شده قابل ردیابی است و تایید کننده هویت سلولهای استخراج شده می باشد.



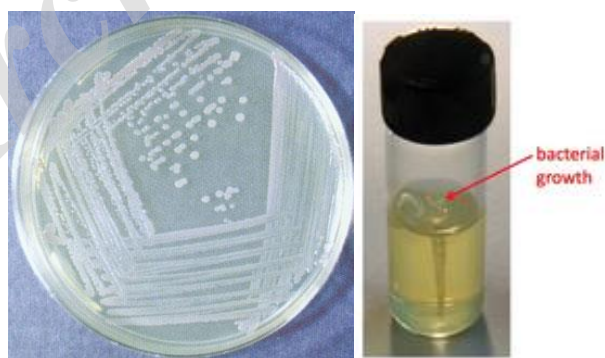
شکل ۴-۵ تجزیه و تحلیل وسترن بلات بیان پروتئین اختصاصی  $\alpha$ -actinin کاردیومیوسیت. چاهک ۱: مارکر پروتئین 11-24KDa (محصول شرکت sinaclon) - چاهک ۲-۴: نمونه کنترل منفی (نمونه پروتئین استخراج شده از سلولهای HUVEC، MCF-7 و فیبروبلاست) - چاهک ۵ و ۸: نمونه پروتئین استخراج شده از سلولهای کاردیومیوسیت جداسازی شده از قلب موش صحرائی - چاهک ۶ و ۷: نمونه کنترل مثبت (نمونه پروتئین جداسازی شده از بافت قلب موش صحرائی)

### ۳-۵- تهیه وکتور کانالروپوسین-۲

شکل ۵-۵- نقشه ژنی وکتور حامل ژن کانالروپوسین ۲ در سویه DH5- $\alpha$  باکتری E-coli که از شرکت addgene تهیه شده است نشان می دهد. پس از ارسال وکتور، تکثیر باکتری حامل در محیط LB مایع حاوی آنتی بیوتیک آمپی سیلین کشت داده و در دمای ۳۷- سانتیگراد منجمد و نگهداری شد (شکل ۵-۶).



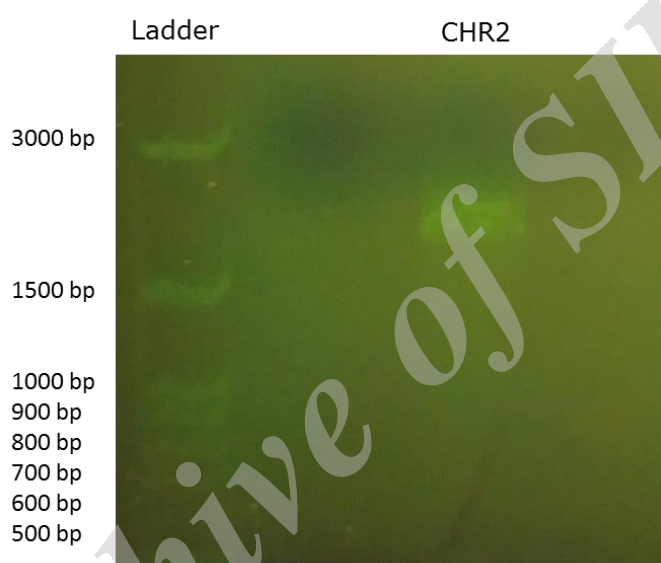
شکل ۵-۵- نقشه ژنی وکتور حامل ژن کانالروپوسین ۲ در سویه DH5- $\alpha$  باکتری E-coli



شکل ۵-۶- تصویر نمونه ارسالی (راست) و کلونی های باکتری DH5- $\alpha$  حامل وکتور ژن کانالروپوسین ۲ در کشت خطی (چپ)

#### ۴-۵- استخراج پلاسمید و تعیین هویت آن به روش PCR

در شکل ۵-۷- تصویر مربوط به الکتروفورز پلاسمید استخراج شده از باکتری DH5 $\alpha$  را نشان می دهد. چاهک ۱ مربوط به مارکر پروتئینی و چاهک دومی مربوط به آغازگر طراحی شده برای قطعه ژنی مورد نظر (کانالروودپسین-۲) می باشد. همانگونه که مشاهده می شود باند مورد نظر در محدوده ۱۸۰۰ bp قابل مشاهده است. به منظور تأیید وجود ژن Chr2 بر روی وکتور حامل، قطعه مورد نظر از روی ژل بازیابی شده و برای توالی یابی به شرکت های مربوطه فرستاده می شود.



شکل ۵-۷- تصویر حاصل از الکتروفورز محصول PCR قطعه ژنی کانالروودپسین از باکتری DH5- $\alpha$  خریداری شده

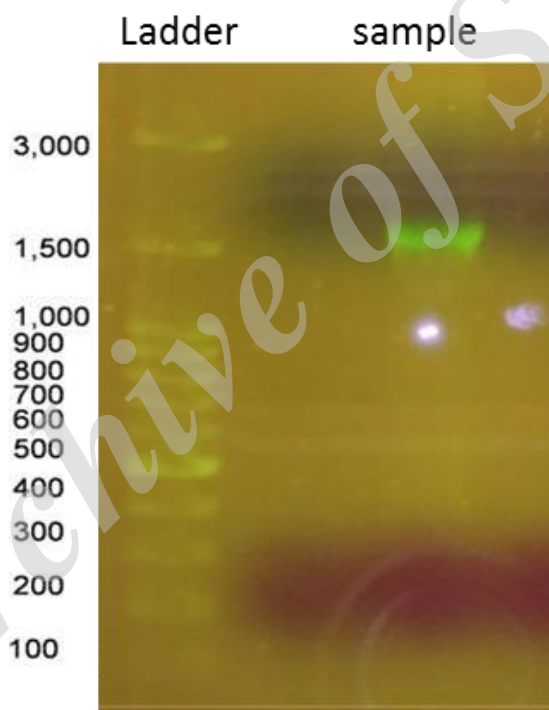
#### ۵-۵- تایید توالی قطعه ژنی کانالروودپسین بر روی پلاسمید DH5- $\alpha$ خریداری شده

نتایج حاصل از توالی یابی سنکر<sup>۱</sup>، با توالی های موجود در پایگاه اطلاعاتی NCBI با استفاده از برنامه BLAST مقایسه گردید. در مقایسه نوکلئوتیدی توالی حاصل، شباهت ۹۹٪ با توالی کامل ژن کانالروودپسین با شماره دسترسی Eu714030 (ژنوم مرجع) نشان داد.

<sup>1</sup> Sanger Sequencing

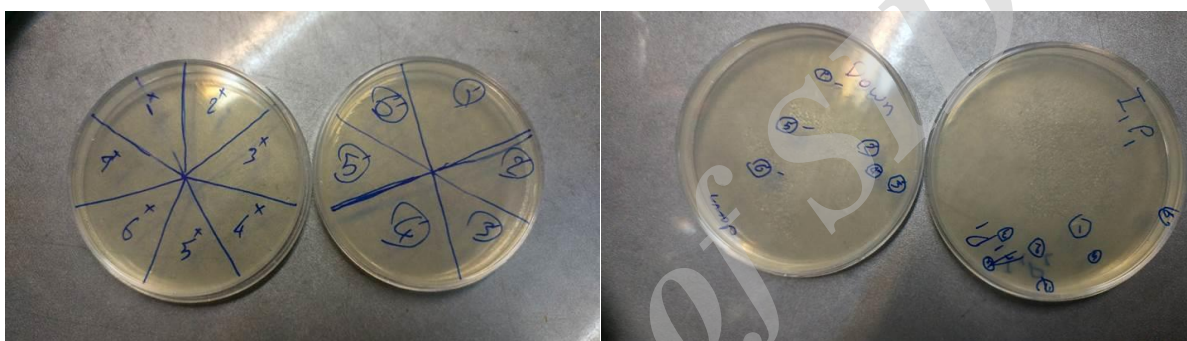
## ۵-۶- نتایج ترانسفورماسیون باکتریها با محصول واکنش اتصال

برای تولید ویروس جهت ترنسفکشن ژن موردنظر، به سه پلاسمید انتقال، بسته بندی و پوششی استفاده شد. همانگونه که در بالا بدان اشاره شد از آنجاییکه وکتور ژن کانالودوپسین به صورت pCDNA3.1 می باشد لذا آغازگری طراحی شد که حاوی توالی مکمل جایگاه برش موجود در ناحیه ORF وکتور ترانسفر (XmnI سمت ۵' و Not I سمت ۳') باشد. پس از طراحی آغازگر مورد نظر، قطعه ژنی مورد نظر با PCR تکثیر شده و با استفاده از الکتروفورز بر روی آغازز تایید شد. نتایج حاصل از ژل الکتروفورز کانالودوپسین-۲ با آغازگر طراحی شده حاوی توالی مکمل Xmn I سمت ۵' و Not I سمت ۳' در شکل ۵-۹ آورده شده است.

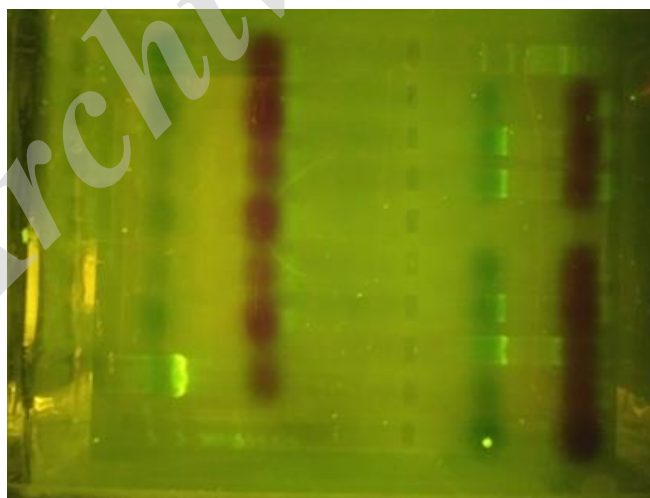


شکل ۵-۹- تصویر الکتروفورز محصول PCR حاصل از ژن کانالودوپسین با آغازگر XmnI سمت ۵' و Not I سمت ۳'

پس از انجام واکنش برش آنزیمی محصول PCR و ناقل کانالرودوپسین-۲ توسط آنزیمهای محدود کننده و انجام واکنش اتصال، ناقل نو ترکیب به درون سویه Top10 باکتری E-coli ترانسفورم شد. پس از کشت این باکتری ها روی محیط کشت حاوی آنتی بیوتیک آمپی سیلین و فراهم آمدن امکان غربال باکتریهای حاوی پلاسمید از باکتریهای فاقد پلاسمید، چند مورد از کلونی های رشد یافته مجزا انتخاب شد (شکل ۵-۱۰) و پس از استخراج پلاسمید، واکنش PCR با آغازگرهای همسانه سازی روی آنها انجام شد تا صرفاً پلاسمیدهایی برای مراحل بعدی انتخاب شود که دارای قطعه مورد نظر باشد. نمونه ای از محصول واکنش کلونی-PCR در شکل ۵-۱۱ آورده شده است.

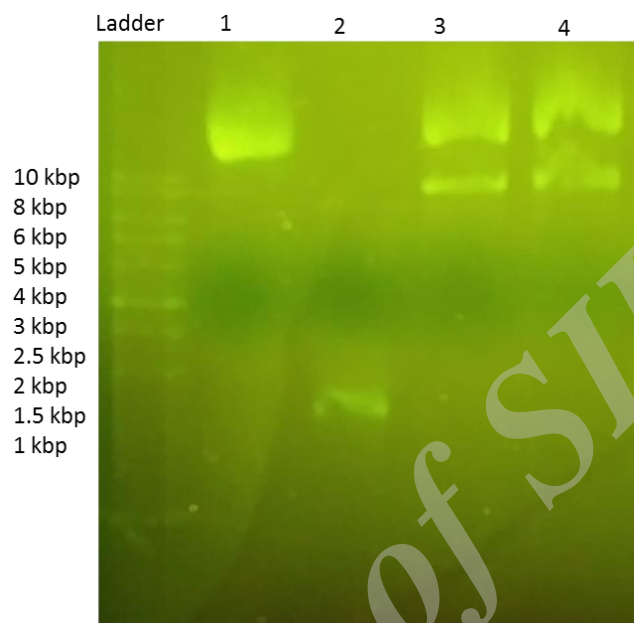


شکل ۵-۱۰- تصویر کلونی های باکتری پس از مرحله اتصال ناقل ترانسفر در باکتریهای E-coli Top10



شکل ۵-۱۱- نتایج الکتروفورز محصولات کلونی-PCR پس از رشد کلونی های باکتری های بدنال مرحله اتصال ناقل ترانسفر

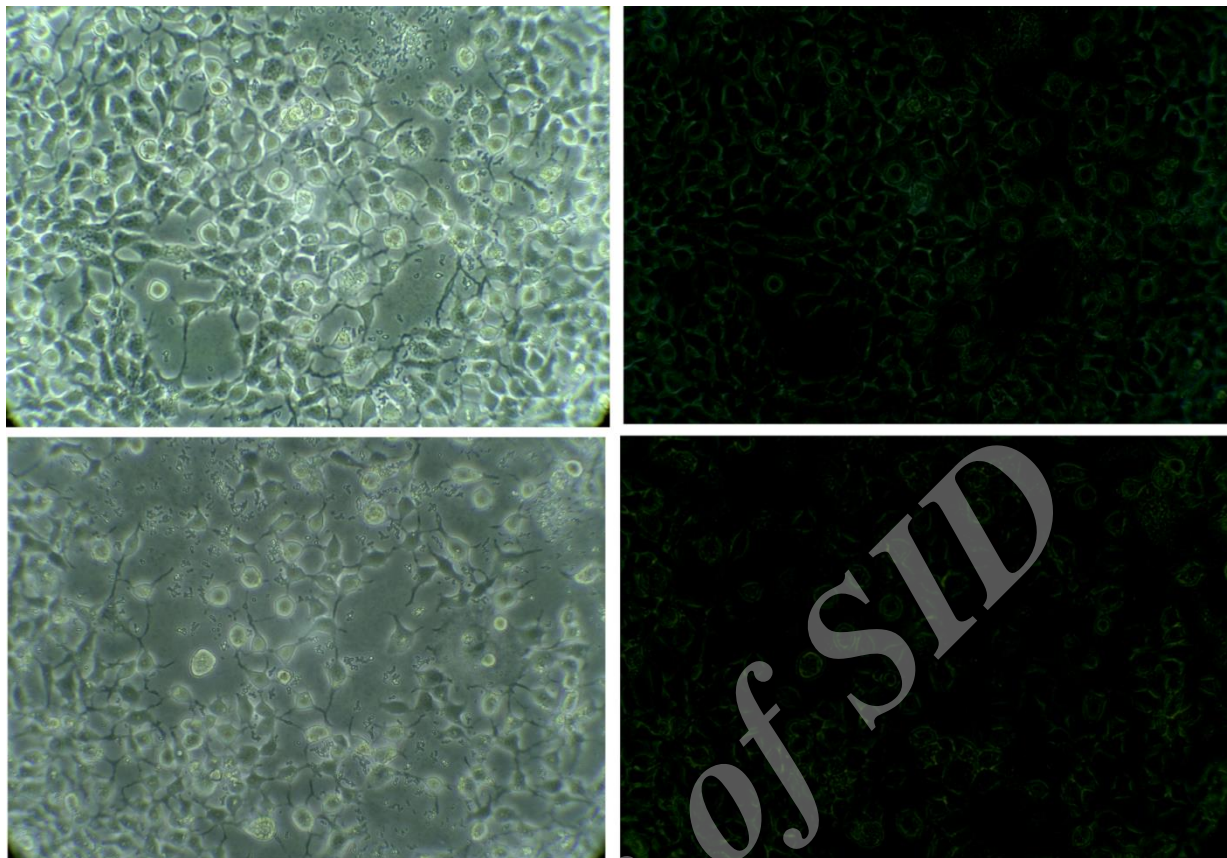
در شکل ۵-۱۱ نتایج برش آنزیمی ناقل استخراج شده توسط آنزیم های محدود کننده Xmn1 و Not 1 را روی ژل الکتروفورز نشان می دهد. تعیین توالی قطعه ژنی کانالرودوپسین کلون شده در ناقل به عنوان گام نهایی و قطعی برای تایید کلون مثبت تلقی می شود. براساس تصویر ۵-۱۱ پلاسمید انتقالی در دو جایگاه ۳ و ۵ بدرستی برش خورده است.



شکل ۵-۱۱- تصویر الکتروفورز محصول PCR حاصل از هضم قطعه ژنی مورد نظر (کانالرودوپسین) و پلاسمید انتقالی با آنزیم Not I و Xmn 1 - کنترل شامل پلاسمید بدون برش، ۱ شامل کنترل مثبت پلاسمید، ۲ و ۳ و ۴ شامل قطعات برشی حاصل هضم آنزیمی است.

#### ۷-۵- بیان پروتئین غشایی کانالرودوپسین-۲ در سلولهای HEK-239T

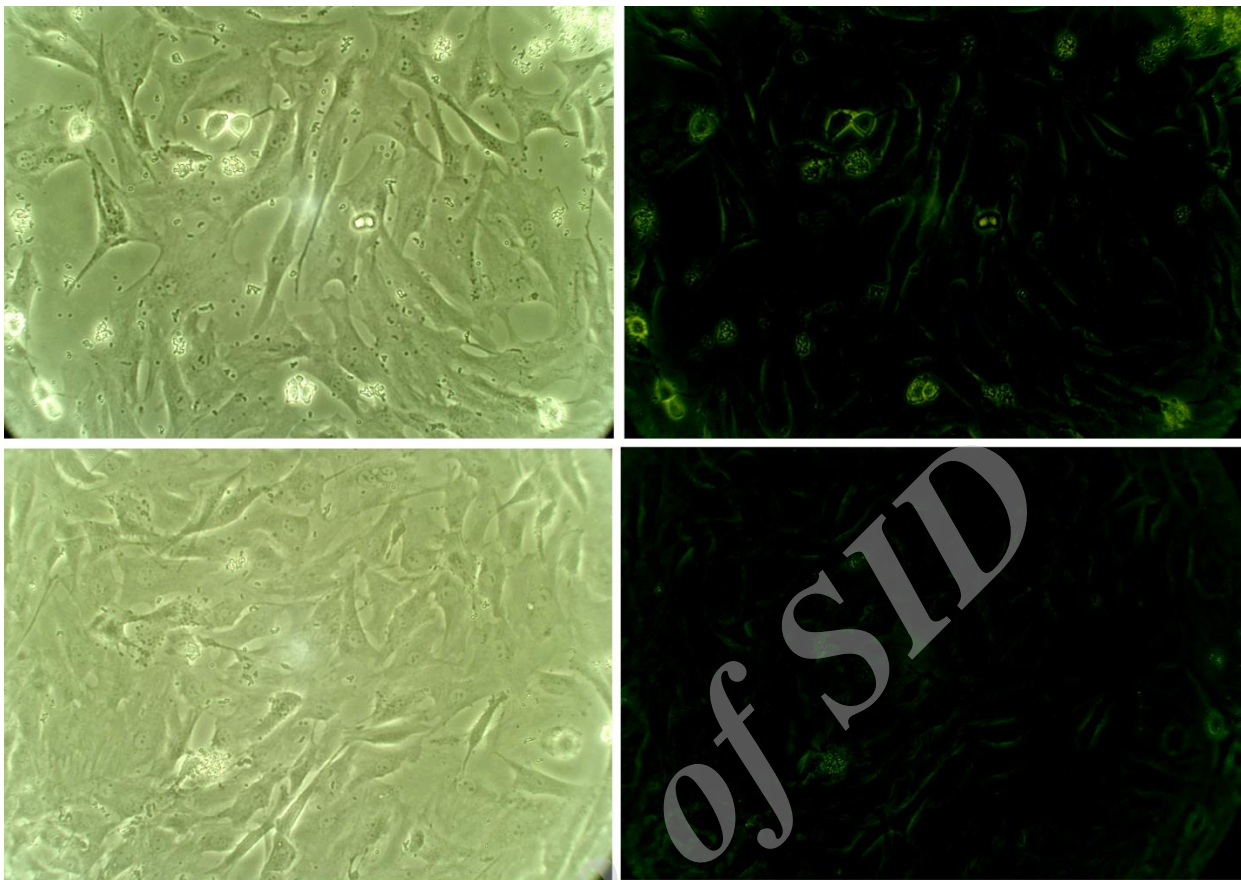
مشاهده مستقیم سلولها پس از ۴۸ ساعت گذشت از آلوده سازی سلولهای HEK-239T نشان داد که پروتئین نشانگر GFP تعداد سلولهای HEK مثبت به طور مثبت تقریباً ۱۰۰ درصد در هر میدان میکروسکوپی است (شکل ۵-۱۲). همانگونه که در عکس نیز مشخص است فلورسنت نور سبز حاصل از GFP متصل به پروتئین غشایی کانالرودوپسین از سطح سلولها می باشد. لذا بیان پروتئین در جایگاه اصلی مورد تایید است.



شکل ۵-۱۲- ترانسفکشن سلولهای HEK-239T، تصویر فاز کنتراست (سمت چپ) و تصویر فلورسنت (سمت راست) از سلولهای ترانسفکت شده. این تصاویر نمایانگر بیان ژن GFP متصل به کانال رودوپسین-۲ در غشای سلولهای HEK-239T می باشد.

#### ۸-۵- بیان پروتئین غشایی کانال رودوپسین-۲ در سلولهای کاردیومیوسیت

مشاهده مستقیم سلولها پس از ۴۸ ساعت گذشت از آلوده سازی سلولهای کاردیومیوسیت نشان داد که پروتئین نشانگر GFP تعداد سلولهای HEK مثبت به طور مثبت  $81 \pm 23$  درصد در هر میدان میکروسکوپی است (شکل ۵-۱۳). همانگونه که در عکس نیز مشخص است فلورسنت نور سبز حاصل از GFP متصل به پروتئین غشایی کانال رودوپسین از سطح سلولها می باشد. لذا بیان پروتئین در جایگاه اصلی مورد تایید است.



شکل ۵-۱۳- ترانسفکشن سلولهای کاردیومیوسیت، تصویر فاز کنتراست (سمت چپ) و تصویر فلورسنت (سمت راست) از سلولهای ترانسفکت شده. این تصاویر نمایانگر بیان پروتئین GFP متصل به کانالرودوپسین-۲ در غشای سلولهای کاردیومیوست نوزاد موش صحرایی می باشد.

#### ۹-۵- بیان کلسیم داخل سلولی پس از تابش نور آبی در سلولهای کاردیومیوسیت

نسبت نور سبز منتشر شده در ۵۱۰ نانومتر با استفاده از تحریک ۳۴۰ به ۳۸۰ در دو گروه سلولهای کاردیومیوسیت حاوی پروتئین غشایی کانالرودوپسین و کاردیومیوسیت‌های غیر ترانسفکت شده پس از تابش نور آبی بررسی شد. بر این اساس تابش نور آبی، باعث افزایش  $1/5 \pm 1/2$  برابر در گروه کاردیومیوسیت‌های حاوی پروتئین غشایی کانالرودوپسین می باشد ( $P > 0.05$ ).



فصل ششم  
بحث و نتیجه گیری

مطالعه حاضر به منظور بومی سازی و کسب دانش فنی اپتوژنتیک قلبی جهت تولید کاردیومیوسیت‌های حاوی کانال‌رودوپسین-۲ می باشد. نتایج این مطالعه نشان می دهد که استفاده از ناقل ویروسی می تواند با بازدهی بالایی موجب بیان پروتئین غشایی کانال‌رودوپسین-۲ در کاردیومیوسیت‌های نوزاد موش صحرایی گردد. بیان این نوع پروتئین علاوه بر امکان مطالعه بر روی رفتار کاردیومیوسیت در محیط کشت و مدل های تجربی سودمند است در آینده در صورت بهبود و ایمنی شرایط انتقال بیان پروتئین کانال‌رودوپسین-۲ این امکان وجود دارد که ضربان سازهای نوری با ایمنی بیشتری جایگزین ضربان سازهای الکتریکی شوند.

فعالیت الکتریکی قلب موجب ایجاد یک فعالیت سیستم بسیار هماهنگ مشخص از نظر زمان و مکان سلولهای قلب می گردد. درک دقیق نقش هر یک از ساختارهای مشخص در شرایط مختلف فیزیولوژیک و پاتولوژیک بدلیل عدم وجود ابزارهای دقیق برای دستکاریهای هدفمند به ویژه در قدرت تفکیک مناسب فضایی و زمانی در مدل‌های تجربی و انسانی با محدودیت مواجه ساخته است. اپتوژنتیک، یک روش اصلاح ژنتیکی غشای سلولها و بافتهای پستانداران است که با استفاده از اسپین های میکروبی (کانالهای یونی یا پمپهای تحت کنترل نور) که این امکان را فراهم می سازد که قدرت تفکیک فضایی و زمانی مناسب را برای مطالعه عملکرد سلولها و بافت قلبی یا عصبی را امکانپذیر کند ( Boyden et al., 2005; Deisseroth et al., 2006; Nagel et al., 2005). این روشهای جدید این امکان را مهیا می سازد که با کنترل دقیق سلولهای عملکردی از جمله سلولهای عصبی و قلبی امکان مطالعه بر روی دستکاریهای اختلاف پتانسیل غشا، غلظتهای یونهای داخل سلولی، کنترل گیرنده، بیان ژن و ... رل بدست آورد. طی دهه گذشته، اپتوژنتیک به طور گسترده در علوم اعصاب و برای مطالعه وضعیت سلامت و بیماری سلولها و بافتهای عصبی استفاده شده است. بدنبال موفقیت‌های چشمگیر در این حوزه، مطالعات مرتبط با قلب جهت مطالعه الکتروفیزیولوژی، آریتمی، سیگنالهای سلولی و انتقال دارویی آغاز شد (Boyle et al., Ambrosi and Entcheva, 2014b; Entcheva, 2013).

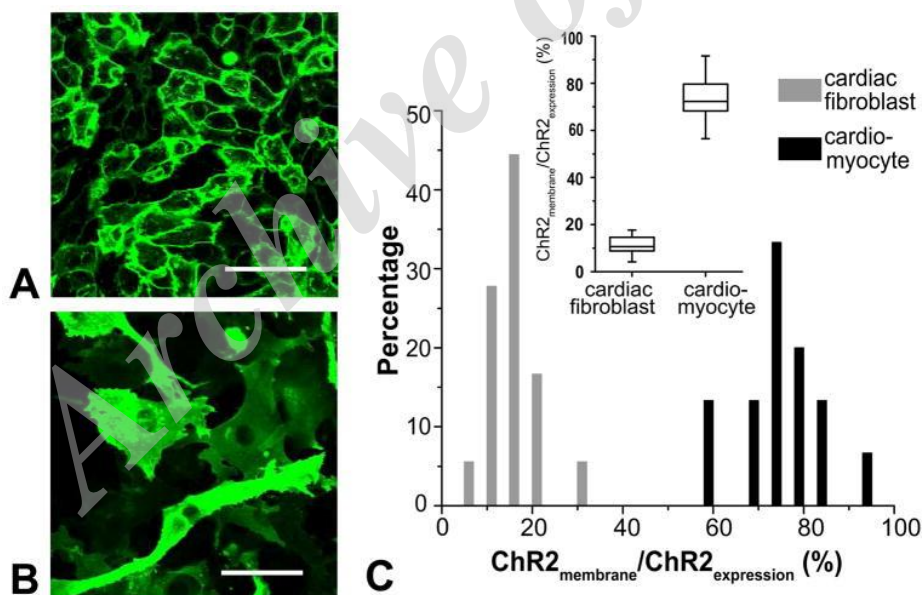
اپسین های میکروبی که در سطح غشای سلولهای پستانداران به روش مهندسی ژنتیک بیان می شود با دپلاریزه کردن (تحریکی) و یا هیپرپلاریزه کردن (مهاری)، باعث مدولاسیون ولتاژ غشای سلولی می شود. اپسین های تحریکی شامل کانالروئوپسین می تواند جریان کافی برای آغاز پتانسیلهای عمل تولید نماید (Nagel et al., 2003) در جایی که اپسین های مهاری شامل آرکیارودوپسین<sup>۱</sup> و هالورودوپسین<sup>۲</sup> باعث مهار فعالیت می شود (Chow et al., 2010). با توجه به نوع کانال و تابش نور با طول موج مناسب آن، مولکولها یا به صورت پاسیو (کانالروئوپسین-کاتیون) یا به صورت فعال از طریق پمپ بر خلاف گرادیانت الکتروشیمیایی (آرکیارودوپسین-پروتون، هالورودوپسین-یون کلر) از غشا عبود کرده و پتانسیل دو سوی غشا را طی هزارم ثانیه تغییر می دهند. در حال حاضر تلاشها بر روی بهینه کردن حساسیت نوری، سرعت عملکرد کانالها و پاسخهای ناشی از آن متمرکز شده است. به عنوان مثال، جایگزین کردن یک اسید آمینه در یک کانالروئوپسین-۲ جهش یافته، موجب افزایش هدایت و یا نفوذ پذیری کلسیم و یا زمان پاسخ کانال به نور گردد (Nagel et al., 2005; Berndt et al., 2011; Kleinlogel et al., 2011). همچنین جهش هایی که باعث شوند طول موج تحریک به سمت قرمز شیفت پیدا کند به منظور نفوذ بهتر در بافت قلب متراکم در مدل های تجربی بسیار کاربردی خواهد بود (Lin et al., 2013). در مطالعات مرتبط با قلب، شایعترین موتانهای تحریکی بر روی کانالروئوپسین-۲ انجام می شود که باعث افزایش دو یا سه برابری هدایت کانال در مقایسه با مدل اصلی آن است (Lin, 2012). تولید بافت قلبی حساس به نور به دو روش امکانپذیر است. اول از طریق اصلاح ژنتیکی برخی یا تمام کاردیومیوسیت ها و دوم از طریق انتقال سلولی. در حالت دوم، سلولهایی که اپسین میکروبی در آنها بیان می شود (شامل سلولهای بنیادی یا فیبروبلاستها) به سلولهای قلبی از طریق اتصال بین سلولی جفت می شوند. در کاربردهای علوم اعصاب اپتوژنتیک بیشتر بر روی دسترسی گسترده پروموتورهای اختصاصی سلولی و انتقال ویروسی اپسین ها به داخل سلولهای عصبی تمرکز یافته است (Diester et al., 2011; Zhang et al., 2007; Liewald et al., 2008). در مطالعات قلب، علاوه بر این که خود کاردیومیوسیتها می توانند به عنوان هدف در نظر گرفته شوند بلکه نوع کاردیومیوسیتها در سیستم هدایتی قلب نیز در مطالعات اپتوژنتیک نیز مورد توجه قرار گرفته اند (Addis et al., 2013; Pacak et al., 2008).

---

<sup>1</sup> Archærhodopsin

<sup>2</sup> Halorhodopsin

در خصوص میزان بازدهی اینترنالیزاسیون کانالروئوپسین-۲ در سلولهای مختلف بافت قلب شامل کاردیومیوسیتها و فیبروبلاستهای قلبی و حتی در مقایسه با سلولهای HEK239T مطالعات مختلفی انجام شده است. مطالعات انجام شده نشان می دهد که کاردیومیوسیتها استخراج شده از جمله از نوزاد موش صحرائی بیش از ۸۰ درصد است. با این حال، این مطالعات نشان می دهد که در مقایسه با کاردیومیوسیتها، فیبروبلاستهای قلبی استخراج شده در برابر انتقال ژن کانالروئوپسین-۲ از طریق ناقله های آدنوویرسی با پروموتور ژنریک CAG به مقادیر بالای دوز ویروسی نیز مقاوم هستند. برای مثال، در یک مطالعه نشان داده شد که میزان انتقال برای کاردیومیوسیتهای نوزاد موش صحرائی بیش از ۹۸ درصد بود اما این میزان برای فیبروبلاستهای قلبی در حدود صفر بود (Ambrosi and Entcheva, 2014a). علاوه بر آن، میزان اینترنالیزاسیون کانالروئوپسین-۲ و انتقال آن در کاردیومیوسیت و سلولهای قلبی در مطالعه دیگری بررسی شد (شکل ۶-۱). در جاییکه متوسط بیان پروتئین کانالروئوپسین در غشای سلولهای کاردیومیوسیت به طور متوسط  $73 \pm 9/3$  درصد بدست آمد این میزان در سلولهای فیبروبلاست  $12 \pm 5/6$  درصد گزارش شد. علت اینکه در مطالعه ما میزان بیان بسیار بالا بود تفاوت در کاردیومیوسیتهای نوزاد و بالغ است.



شکل ۶-۱- مقایسه بیان پروتئین غشایی کانالروئوپسین-۲ در رده کاردیومیوسیتها و فیبروبلاستهای قلبی اولیه مطالعه Ambrosi et al.

به طور کلی می توان نتیجه گیری کرد که میزان بازدهی روش استفاده از ناقل ویروسی برای انتقال ژن کانالرودوپسین -۲ به سلولهای قلبی جدا شده از نوزاد موش صحرائی بسیار مناسب بوده و می تواند به منظور مطالعات رفتار سلولی کاردیومیوسیتها به خوبی مورد استفاده قرار گیرد. با این حال استفاده از این روش در بالین ایمن نیست و لازم است در آینده برای کاربردهای پیش بالینی و یا بالینی روشهای انتقال ژنی به جزء ناقلین ویروسی در نظر گرفت. در حال حاضر تمرکز بر روی روشهای tandem-cell-unit approach (TCU) است که بتوان کنترل عملکرد سلولهای قلبی با استفاده از سایر سلولهای ترانس ژنیک انجام شود.

Archive of SID

منابع

Archive of SID



## **Final report**

**(Title):**

### **Control of Cardiac Mammalian Cells through Optogenetics in Isolated Rat Cardiomyocyte**

**Code: 11-2441**

**Ref. No. of Research Ethics Committee: IR.ACECR.IBCR.REC.1395.22**

**Principal Investigator (BY):  
Gholamreza Esmaeeli Djavid, MD, PhD**

**Name of Research Institute:**  
Medical Laser Research Center,  
Tehran University of Medical Sciences Branch of  
Academic Center for Education, Culture and Research (ACECR)

**Research group:  
Photo-Tissue Repair Research Group**

**March 2018**