تاثیر فاکتور رشد فیبروبلاستی در تمایز سلول‌های بنیادی جنینی به کاردیومیوسیت‌ها

شیوا خضری .M.Sc[☆]، مجتبی رضازاده ولوجردی .Ph.D [☆☆♦]، حوری سپهری .Ph.D[☆]، حسین بهاروند .Ph.D[★]

☆ دانشگاه تهران، دانشکده علوم، گروه زیست‌شناسی

☆ پژوهشکده رویان، گروه جنین‌شناسی

★ پژوهشکده رویان، گروه سلول‌های بنیادی

☆ دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه آناتومی

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

پست الکترونیک: Email: info@royaninstitute.org

چکیده

دریافت مقاله: ۸۴/۳/۲۶، پذیرش مقاله: ۸۴/۷/۲۶

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

*** مواد و روش‌ها:** تعداد ۸۰۰ سلول بنیادی جنینی موش(RoyanB1) در قطرات آویزان و در پتری دیش کشت شدند. پس از دو روز سلول‌های (Embryonic Stem: ES) در هر قطره جمع شده و تشکیل اجسام شبه جنینی(Embryoid Body: EB) را دادند. به دنبال آن EBها به مدت پنج روز دیگر در ظروف باکتریایی کشت شدند. در دو روز اول، سلول‌ها با ۱۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر فاکتور رشد فیبروبلاستی (basic Fibroblast Growth Factor: bFGF) تیمار شدند. سپس EBها در ظروف ۲۴ خانه کشت شدند. تعداد ضربان در دو گروه کنترل وbFGF هر روز شمارش شد و تاثیر داروهای کرونوتروپی ایزوپرنالین و فنیل افرین وکارباکول بر کاردیومیوسیت‌های حاصل در روزهای ۳+۷، ۷+۷، ۱۴+۷ بررسی شد. همچنین بیان ژن‌های خاص قلبی ازجمله α-MHC (Myosin Heavy Chain), β-MHC, MLC-2V (Myosin Light Chain), ANF (Atrial Natriuretic Factor)، β-Tubulin، oct-4 در روز ۱۴+۷ در دو گروه کنترل و bFGF با استفاده از RT-PCR ارزیابی شد. به علاوه ایمونوهیستوشیمی با رنگ‌آمیزی کاردیومیوسیت‌ها با آنتی‌بادی علیه α -actinin انجام شد.

*** یافته‌ها:** نتایج شمارش روزانه نشان داد که EBهای گروه کنترل تعداد ضربان در دقیقه بیشتری نسبت به گروه bFGF دارند. همچنین تست فارماکولوژیکی نشان داد که افزایش تعداد ضربان در دقیقه در پاسخ به ایزوپرنالین و فنیل افرین در مراحل اولیه تکوین (روز ۳+۷) در گروه bFGF نسبت به گروه کنترل بیشتر بود (P<۰/۰۳۵ و P<۰/۰۱۹). داروی کارباکول سبب کاهش تعداد ضربان در دقیقه در هر دو گروه شد اما تفاوتی در میزان ضربان هر دو گروه دیده نشد. نتیجهٔ آنالیز RT-PCR نشان داد که ژن‌های β-tubulin، α-MHC MLC-2V، β-MHC و ANF در روز۱۴+۷ بیان شد اما تفاوتی در بیان ژن‌ها در دو گروه کنترل و bFGF دراین روز مشاهده نشد و oct-4 در هیچ گروه بیان نشد همچنین ایمونوهیستوشیمی سازماندهی سارکومریک کاردیومیوسیت‌ها را در هر دو گروه نشان داد ولی تفاوتی در آرایش میوفیبریلی آنها دیده نشد.

*** نتیجه‌گیری:** از نتایج به دست آمده می‌توان استنباط کرد که bFGF با اینکه بر تجلی یا عملکرد گیرنده‌های α1- آدرنرژیک و β1- آدرنرژیک در کاردیومیوسیت‌ها موثر است ولی با شرایط موجود به تنهایی در تمایز کاردیومیوسیت‌ها از سلول‌های بنیادی جنینی نقشی ندارد .

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

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

مقدمه

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

مواد و روش‌ها

کشت سلول‌های بنیادی

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

تمایز سلول‌های بنیادی جنینی (ES)

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

آزمون دارویی

کاردیومیوسیت‌ها طی روزهای ۳+۷، ۷+۷ و ۱۴+۷ با داروهای ایزوپرنالین (Sigma, I-5879) و فنیل افرین (Sigma p-6126) و کارباکول (Sigma, G4382) با غلظت 10^{-5}مولار تیمار شدند. ایزوپرنالین آگونیست گیرنده‌های β1– آدرنرژیک و فنیل افرین آگونیست گیرنده‌های α1– آدرنرژیک و کارباکول آگونیست گیرنده‌های موسکارینی است (۱۶). تعداد ضربان در دقیقه قبل از تیمار با داروها شمارش شده و بعد از اضافه کردن دارو حدود ۳ دقیقه داخل انکوباتور قرار داده شدند سپس دوباره تعداد ضربان در دقیقه شمارش شد تفاضل این دو شمارش نشان دهنده تأثیر دارو روی کاردیومیوسیت‌ها بوده است به علاوه محیط تمایزی knockout

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

آنالیز RT-PCR

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

۱- استخراج RNA از کاردیومیوسیت‌ها: به منظور جداسازی RNA از سلول‌های ES از کیت RNX^{TM}(PLUS) شرکت سیناژن استفاده شد.

۲- نسخه‌برداری معکوس: cDNA با کمک پرایمرهای هگزامر تصادفی و با استفاده از کیت Revert Aid^{TM} H Minus First strand cDNA synthesis (Fermentas, k1632) که دارای آنزیم M- Mulv Reverse transcriptase بود سنتز شد. برای کنترل مثبت و چک کردن واکنش RT از β–Tubulin استفاده شد.

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

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

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

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

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

ایمونوهیستو شیمی

برای تایید ماهیت کاردیومیوسیت‌های حاصل از سلول‌های بنیادی جنینی و مشاهده سازماندهی سارکومریک آنها رنگ‌آمیزی ایمنی به کار برده شد. برای این منظور در روز ۱۴+۷ کاردیومیوسیت‌های دو گروه کنترل و bFGF با پیپت جدا شده و با آنتی‌بادی علیه α-اکتینین (Sigma, A- 5044) رنگ‌آمیزی شدند.

آزمون آماری

داده‌ها با برنامه SPSS و با روش آماری t-test، Mann-whitney Test آنالیز شدند و به صورت SEM± میانگین (خطای استاندارد) نمایش داده شدند. اختلاف میانگین تعداد ضربان روزانه در دقیقه در گروه کنترل وbFGF با این تست‌ها مقایسه و همچنین اختلاف داده‌های قبل و بعد از تیمار با داروها به صورت SEM± میانگین در گروه کنترل و bFGF هم با این تست‌ها بررسی شدند. P<۰/۰۵ به عنوان معنی‌دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

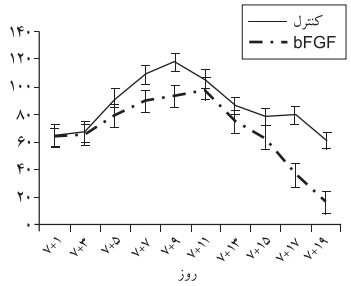
نتایج شمارش روزانه ضربان

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

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

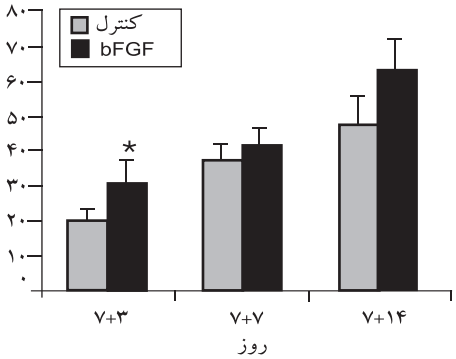
(تفاوت دو گروه در روز ۵+۷ با P<۰/۰۱۲، روز ۷+۷ با P<۰/۰۰۲، روز ۹+۷ با P<۰/۰۰۰۱، روز ۱۷+۷ با P<۰/۰۱۴ و روز ۱۹+۷ با P<۰/۰۰۱ معنی داربود) (نمودار۱).

ژنها	توالی پرایمرها (۵'→۳')	اندازه	دمای ذوب
α-MHC	CTGCTGGAGAGGTTATTCCTCC GGAAGAGTGAGGGGGGCATCAAGG	bp۳۰۱	۶۴ درجه سانتی‌گراد
β-MHC	TGCAAAGGCTCCAGGTCTGAGGGC GCCAACACCAACCTGTCCAAGTTC	bp۲۰۵	۶۴ درجه سانتی‌گراد
MLC-2V	TGTGGGTCSCTGAGGCTGTGGTTCAG GAAGGCTGACTATGTCCGGGATGC	bp۱۸۹	۶۰ درجه سانتی‌گراد
ANF	TGATAGATGAAGGCAGGAAGCCGC AGGATTGGAGCCCAGTGGACTAGG	bp۲۰۳	۶۴ درجه سانتی‌گراد
Oct-4	GGCGTTCTCTTTGGAAAGGTCTTC CATACTCGAACCACATTCTCTA	bp۳۱۷	۷۰ درجه سانتی‌گراد
β-Tubulin	GGAACATAGCCGTAAACTGC TCACTGAGCCTGAACTTACC	bp۳۱۷	۶۰ درجه سانتی‌گراد

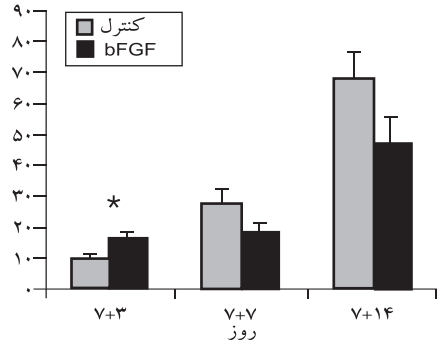


نمودار ۱: مقایسه تعداد ضربان روزانه در دو گروه کنترل و bFGF (P<۰/۰۵*)

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



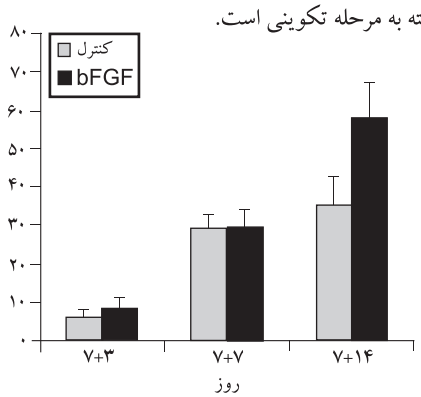
نمودار ۲: مقایسه افزایش ضربان کاردیومیوسیت‌های تیمار شده با ایزوپروترنالین در دو گروه کنترل و bFGF (P<۰/۰۳۵*)



نمودار ۳: مقایسه افزایش ضربان کاردیومیوسیت‌های تیمار شده با فنیل افرین در دو گروه کنترل و bFGF (P<۰/۰۱۱*)

نتایج مطالعات فارماکولوژیکی

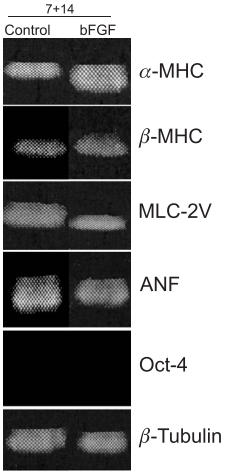
بنا به مطالعهٔ هسلر و همکاران (۱۶) تغییرات تکوینی کاردیومیوسیت‌ها با توجه به طول زمان کشت به سه مرحله تمایزی تقسیم می‌شود: ابتدایی، میانی و نهایی. که به ترتیب شامل روزهای ۱+۷ تا ۴+۷، ۵+۷ تا ۸+۷ و ۹+۷ تا ۱۸+۷ می‌شود. لذا روزهای ۳+۷، ۷+۷، ۱۴+۷ را به عنوان روزهای شاخص در سه دوره مذکور انتخاب کرده و داروهای مورد نظر به کار برده شد. آزمون دارویی نشان داد به کارگیری ایزوپرنالین(P<۰/۰۳۵) و فنیل افرین (P<۰/۰۱) سبب افزایش معنی‌دار تعداد ضربان گروه bFGF نسبت به گروه کنترل در روز ۷+۳ شد (نمودار ۲ و ۳). کاهش ضربان کاردیومیوسیت‌های تیمار شده با کارباکول در تمام روزها در گروه bFGF بیشتر از کنترل بود ولی این تفاوت‌ها معنی‌دار نبود (نمودار ۴). تاثیر تمام داروها بر کاردیومیوسیت‌های حاصل در دو گروه کنترل و bFGF نشان داد که پاسخ کرونوتروپی با افزایش روند تکوین کاردیومیوسیت‌ها از مرحلهٔ ابتدایی (روز ۳+۷) تا مرحله نهایی (روز ۱۴+۷) افزایش معنی‌داری می‌یابد و به عبارتی پاسخ کاردیومیوسیت‌ها به داروها وابسته به مرحله تکوینی است.



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

نتایج آنالیز RT-PCR

آنالیز RT-PCR بیان ژن‌های α-MHC، β-MHC، ANF، MLC-2V و β-tubulin را در دو گروه کنترل و bFGF نشان داد و ژن oct4 در هیچ گروهی مشاهده نشد همچنین بیان ژن‌ها تفاوتی در دو گروه نداشت (شکل ۱).

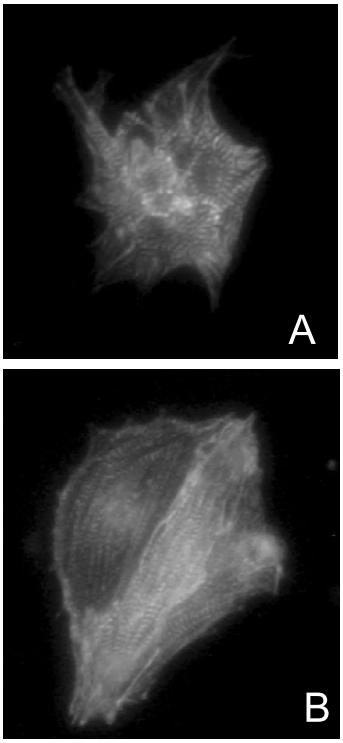


شکل ۱: بیان ژن‌های خاص قلبی در دو گروه کنترل و bFGF به وسیله RT-PCR

نتیجه مطالعات ایمونوهیستوشیمی

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

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



شکل ۲: رنگ‌آمیزی ایمونوهیستوشیمی کاردیومیوسیت‌ها با آنتی‌بادی علیه در دو گروه(A) کنترل و (B) bFGF

(مشاهده نمونه رنگی شکل در انتهای مقالات)

بحث

در این مطالعه سلول‌های بنیادی جنینی به طور خود به خودی به کاردیومیوسیت‌های ضربان‌دار متمایز شدند. نتیجهٔ آنالیزهای انجام شده نشان داد که پاسخ کاردیومیوسیت‌های گروه bFGF به داروها بیشتر از گروه کنترل بود ولی تعداد ضربان در دقیقه در گروه کنترل بیشتر از bFGF بود. افزایش ضربان کاردیومیوسیت‌های تیمار شده با فنیل افرین و ایزوپرنالین و کاهش ضربان این سلول‌ها در پاسخ به کاباکول در هر دو گروه با پیشرفت تکوین، بیشتر شد. آنالیز RT-PCR نیز هیچ تفاوتی در بیان ژن‌های خاص قلبی در دو گروه کنترل وbFGF نشان نداد. از جمله فاکتورهای رشدی که در in vivo بر تشکیل قلب مهره‌داران تاثیر می‌گذارد، FGF است. مطالعهٔ انجام شده روی جوجه نشان می‌دهد که سیگنال‌های FGF رشد میوسیت‌های قلبی را در مرحله توبولار تنظیم می‌کند و تخریب گیرنده‌های FGF، تکثیر و بقا قلب جنینی جوجه را در این مرحله متوقف و القا سلول‌های مزودرمی محتوی پیش‌سازهای میوسیتی را در هفته اول تکوین جنینی مهار می‌کند اما بعد از هفته دوم چنین تاثیری ندارد (۱۴). در مطالعه ما هم bFGF تاثیری بر تمایز کاردیومیوسیت‌ها از سلول‌های بنیادی جنینی در مراحل انتهایی تکوین (روز۱۴+۷) نداشت. گزارشات نشان می‌دهد که در جنین‌های جوجه، BMP2 به طور اکتوپیکی، سبب افزایش تجلی ژن fgf8 می‌شود. بنابراین fgf8 به عنوان فرودست BMP2 عمل می‌کند (۱۴).

به طور مشابه فقدان BMP4 در جنین‌های موش باعث عدم بیان fgf8 می‌شود و جهش حذفی ژن fgf8 در موش باعث ایجاد تقارن راست- چپ غیرعادی و سایر ناهنجاری‌های قلبی می‌شود. در مزودرم خلفی، همراهی BMP2 و FGF4 می‌تواند تشکیل قلب را تحریک کند به طوری که هیچ کدام از این فاکتورها به تنهایی نمی‌توانند چنین کاری انجام دهند. بنابراین سیگنال‌های FGF، BMP برای مشتق شدن سلول‌های مزودرمی قلبی تمایز یافته با هم همکاری می‌کنند (۱۸، ۱۹). در مطالعه ما هم شاید علت بی‌تاثیر بودن bFGF بر تمایز کاردیومیوسیت‌ها در محیط آزمایشگاهی این باشد که به تنهایی نقشی در تمایز ندارد و باید همراه فاکتورهای دیگر استفاده شود. علاوه بر این گزارشات، تمایز سلول‌هایp19 به سلول‌های قلبی و اسکلتی در حضور FGF و غلظت مناسب اسید رتینوییک هم مطالعه شده است. مشاهدات نشان می‌دهد که :(acidic Fibroblast Growth Factor aFGF) خارجی، ژن α-MHC قلبی را با القای BMP4 و GATA4 فعال می‌کند و باعث تمایز قلبی می‌شود اما برخلاف bFGF aFGF، خارجی بیان noggin (آنتاگونیست BMP4) را افزایش داده و بیان GATA را مهار می‌کند و در کل باعث تمایز ماهیچه اسکلتی می‌شود (۲۰). نتیجه تحقیق ما نیز مشابه این گزارش بود به طوری که bFGF تمایز ماهیچه اسکلتی را بیشتر کرد (داده ها منتشر نشده است) ولی اثر فزآینده‌ای بر تمایز سلول‌های قلبی نداشت. مطالعات انجام شده در in vivo روی کاردیومیوسیت‌های موشی نشان می‌دهد که این سلول‌ها انواع گیرنده‌ها از جمله α1، β1 و β2-آدرنوسپتورها و گیرنده‌های موسکارینی را بیان می‌کنند (۲۱). نتایج ما هم نشان داد که کاردیومیوسیت‌های مشتق شده از سلول‌های بنیادی جنینی این گیرنده‌ها را بیان می‌کنند به طوری که پاسخ این سلول‌ها به ایزوپرنالین و فنیل افرین در مرحله ابتدایی تکوین (روز ۳+۷) در گروهbFGF بیشتر از گروه کنترل بود بنابراین bFGF تجلی یا عملکرد گیرنده‌های α1، β1- آدرنرژیک را تسریع می‌کند. در کاردیومیوسیت‌های متمایز شده از ES شکل‌های مختلف پتانسیل عمل با بیان انواع کانال‌های یونی هماهنگ است (۲۲). کاردیومیوسیت‌های مراحل اولیه تمایز، کانال‌های Ca^{2+} نوع L وابسته به ولتاژ و کانال‌های K^{+} را بیان می‌کنند. در کاردیومیوسیت‌های مراحل میانی، کانال‌های Na^{+} و Ca^{2+} و K^{+} تولید می‌شود. در مرحله نهایی تمایز کانال‌های Ca^{2+} سه برابر مرحله اولیه تمایز بیان می‌شود. به علاوه انواع کانال‌های K^{+} و کانال‌های Na^{+} هم در این مرحله بیشتر می‌شوند (۱۶). کانال‌های Ca^{2+} نوع L وابسته به ولتاژ نقش مهمی در تولید ضربان در کاردیومیوسیت‌ها و تولید پتانسیل عمل سینوسی گرهی و دهلیزی بطنی ایفا می‌کنند به طوری که مهارکننده‌های کانال‌های کلسیمی اثرات کرونوتروپیک منفی روی کاردیومیوسیت‌ها ایجاد می‌کنند (۲۳). کانال‌های Na^{+} درمراحل اولیه تمایز (۲+۷ تا ۳+۷) دیده نمی‌شوند اما در مدت تکوین ظاهر می‌شوند. تراکم این کانال‌ها با پیشرفت تکوین کاردیومیوسیت‌ها بیشتر می‌شود (۱۶). افزایش پاسخ کاردیومیوسیت‌ها به داروها با پیشرفت تکوین از روز ۳+۷ تا۱۴+۷ به دلیل افزایش کانالهای یونی است.

نتیجه گیری

به طور کلی از مطالعات انجام شده چنین به نظر می‌رسد که bFGF با اینکه در محیط in vivo سبب القا مزودرم قلب‌زا و تکوین قلب می‌شود ولی در محیط آزمایشگاهی به تنهایی چنین نقشی را ندارد و تعداد ضربان کاردیومیوسیت‌های مشتق از سلول‌های بنیادی جنینی افزایش فزاینده‌ای نمی‌یابد ولی تجلی گیرنده‌های β1, -α1 آدرنرژیک یا عملکرد آنها در ابتدای تکوین (۳+۷) بیشتر می‌شود، به طوری که به کار گیری ایزوپرنالین و فنیل افرین در این روز سبب افزایش معنی‌دار تعداد ضربان در گروه bFGF نسبت به گروه کنترل می‌شود.

تقدیر و تشکر

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

Refrences

1. Gorba T, Allsopp TE: Pharmacological potential of embryonic stem cells. Pharmacol Res. 2003 ;47: 269-278

2. Evans MJ, Kaufman MH: Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. Nature. 1981; 292: 154-156

3. Martin GR: Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. Proc Natl Acad Sci 1981; 78: 7634-7638

4. Montgomery MO, Litvin J, Gonzalez-Sanchez A, Bader D: Staging of commitment and differentiation of avian cardiac myocytes. Dev Biol. 1994; 164: 63-71

5. Schultheiss TM, Xydas S, Lassar AB: Induction of avian cardiac myogenesis by anterior endoderm. Development. 1995; 121: 4203-4214

6. Orkin SH: GATA-binding transcription factors in hematopoietic cells. Blood. 1992; 80: 575-581

7. Behfar A, Zingman LV, Hodgson DM, Rauzier JM, Kane GC, Terzic A, Puceat M: Stem cell differentiation requires a paracrine pathway in the heart. FASEB J. 2002; 16: 1558-1566

8. Fishman MC, Chien KR: Fashioning the vertebrate heart: earliest embryonic decisions. Development. 1997; 124: 2099-2117

9. Wu H, Lee SH, Gao J, Liu X, Iruela-Arispe ML: Inactivation of erythropoietin leads to defects in cardiac morphogenesis. Development. 1999; 126: 3597-3605

10. Sachinidis A, Fleischmann BK, Kolossov E, Wartenberg M, Sauer H, Hescheler J: Cardiac specific differentiation of mouse embryonic stem cells. Cardiovasc Res 2003; 58: 278-291

11. Schuldiner M, Yanuka O, Itskovitz-Eldor J, Melton DA, Benvenisty N: Effects of eight growth factors on the differentiation of cells derived from human embryonic stem cells. Proc Natl Acad Sci 2000; 97: 11307-11312

12. Reifers F, Walsh EC, Leger S, Stainier DY, Brand M: Induction and differentiation of the zebrafish heart requires fibroblast growth factor 8 (fgf8/acerebellar). Develop 2000; 127: 225-235

13. Detillieux KA, Sheikh F, Kardami E, Cattini PA: Biological activities of fibroblast growth factor-2 in the adult myocardium. Cardiovasc Res. 2003; 57: 8-19

14. Mima T, Ueno H, Fischman DA, Williams LT, Mikawa T: Fibroblast growth factor receptor is required for in vivo cardiac myocyte proliferation at early embryonic stages of heart development. Proc Natl Acad Sci 1995; 92: 467-471

15. Baharvand H, Matthaei KI: Culture condition difference for establishment of new embryonic stem cell lines from the C57BL/6 and BALB/c mouse strains. In Vitro Cell Dev Biol Anim 2004; 40: 76-81

16. Hescheler J, Fleischmann BK, Lentini S, Maltsev VA, Rohwedel J, Wobus AM, Addicks K: Embryonic stem cells: a model to study structural and functional properties in cardiomyogenesis. Cardiovasc Res 1997; 36: 149-162

17. Fassler R, Rohwedel J, Maltsev V, Bloch W, Lentini S, Guan K, Gullberg D, Hescheler J, Addicks K, Wobus AM: Differentiation and integrity of cardiac muscle cells are impaired in the absence of beta 1 integrin. J Cell Sci 1996; 109: 2989-2999

18. Brand T: Heart development: molecular insights into cardiac specification and early morphogenesis. Dev Biol 2003; 258: 1-19

19. Lough J, Barron M, Brogley M, Sugi Y, Bolender DL, Zhu X: Combined BMP-2 and FGF-4, but neither factor alone, induces cardiogenesis in non-precardiac embryonic mesoderm. Dev Biol 1996; 178: 198-202

20. Hidai C, Masako O, Ikeda H, Nagashima H, Matsuoka R, Quertermous T, Kasanuki H, Kokubun S, Kawana M: FGF-1 enhanced cardiogenesis in differentiating embryonal carcinoma cell cultures, which was opposite to the effect of FGF-2. J Mol Cell Cardiol 2003; 421: 5-35

21. Hakuno D, Fukuda K, Makino S, Konishi F, Tomita Y, Manabe T, Suzuki Y, Umezawa A, Ogawa S: Bone marrow-derived regenerated cardiomyocytes (CMG Cells) express functional adrenergic and muscarinic receptors. Circulation 2002; 22; 105: 380-386

22. kleppish T, Wobus AM, Hescheler J: Voltage-depended L-type ca channels and a novel type of non selective cation channel activated by cAMP-depended phosphorylation in mesoderm-like cells.cell signal 1993; 5: 727-734

23. Wobus AM, Wallukat G, Hescheler J: Pluripotent mouse embryonic stem cells are able to differentiate into cardiomyocytes expressing chronotropic responses to adrenergic and cholinergic agents and Ca2+ channel blockers. Different 1991; 48: 173-182