

***Evaluation of the differentiation process of human bone marrow mesenchymal stem cells to cardiomyocyte-like cells: An in vitro study***

***Saheli M., M.Sc., Hosseini A., Ph.D., Piryaee A., Ph.D.\*, Fadaei Fathabadi F., Ph.D., Bandehpour M., Ph.D., Salehi M., Ph.D., Norouzian M., Ph.D.***

*\*P.O.Box: 19395-4719, Department of Biology and Anatomical Sciences, School of Medicine, Shaheed Beheshti Medical Sciences University, Tehran, Iran*

Received: Sep 2011

Accepted: Nov 2011

***Abstract***

**Purpose:** To evaluate the development of cardiomyocyte-like cells derived from human bone marrow mesenchymal stem cells induced by 5-azacytidine (5-aza) under *in vitro* condition.

**Materials and Methods:** Human bone marrow mesenchymal stem cells (BMMSCs) were purified, then the cells were induced by 5 $\mu$ M 5-aza for 5 weeks. To transdifferentiate into cardiomyocyte, the culture medium of human BMMSCs was changed every 24 hours, in the way that the cells were put in the culture medium containing 5-aza for 24 hours and, then were put in a culture medium free of the said material for another 24 hours, and this process continued until sampling. RT-PCR assay was performed to detect the expression of specific myocardium genes including  $\alpha$ -actinin, myosin heavy chain (MHC) and connexin-43 each weeks after first induction. Fluocytometry was used to determine the expression of specific myocardium proteins including  $\alpha$ -actinin, troponin and connexin-43 at 3<sup>rd</sup> and 5<sup>th</sup> weeks after the first induction.

**Results:** The expression of all three myocardium genes was detected 1 to 5 weeks after induction in a time-dependent manner. There was a continuous increase in expression of  $\alpha$ -actinin and connexin-43 genes from the 1<sup>st</sup> to the 5<sup>th</sup> week, while mRNA of MHC gene was at the highest level in the forth week. The expression of  $\alpha$ -actinin and troponin proteins was equal after three and five weeks, whereas that of the connexin-43 was higher after five weeks in comparison to the 3<sup>rd</sup> week.

**Conclusion:** The current study indicated that stimulating human bone marrow mesenchymal stem cells by 5-aza with the concentration of 5 $\mu$ M under *in vitro* condition can lead to differentiating cardiomyocyte-like cells. Furthermore prolonged culture duration may lead to more differentiated cells.

**Key words:** Mesenchymal stem cell (MSCs), Differentiation, Cardiomyocyte

## بررسی روند تمایز سلول‌های شبه کاردیومیوسیت مشتق از سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان انسان در محیط آزمایشگاه

مونا ساحلی <sup>M.Sc.\*</sup>، احمد حسینی <sup>Ph.D.\*</sup>، عباس پیریایی <sup>Ph.D.\*\*</sup>، فاطمه فدایی فتح آبادی <sup>Ph.D.\*</sup>

مژگان بنده پور <sup>Ph.D.\*\*</sup>، محمد صالحی <sup>Ph.D.\*\*</sup>، محسن نوروزیان <sup>Ph.D.\*</sup>

\* گروه بیولوژی و علوم تشریح دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

\*\* مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

\*\*\* گروه بیوتکنولوژی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

تاریخ دریافت: شهریور ماه ۹۰ تاریخ پذیرش: آذرماه ۹۰

### چکیده

**هدف:** بررسی چگونگی روند تمایز سلول‌های شبه کاردیومیوسیت مشتق از سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان انسان، تحت تأثیر 5-azacytidine (5-aza) در شرایط آزمایشگاهی

**مواد و روش‌ها:** سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان انسان پس از تخلیص به مدت ۵ هفته برای القای تمایز کاردیومیوسیتی تحت تأثیر 5-aza با غلظت ۵ میکرومول قرار گرفتند. برای القای تمایز کاردیومیوسیتی، محیط کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان انسان، به‌طور متوالی هر ۲۴ ساعت یک‌بار تعویض شد، بدین ترتیب که سلول‌ها ۲۴ ساعت در محیط کشت حاوی 5-aza و ۲۴ ساعت در محیط کشت فاقد این ماده قرار گرفتند و این روند تا زمان نمونه‌برداری ادامه داشت. برای بررسی روند تمایز سلول‌ها از مقایسه الگو و میزان بیان mRNA ژن‌های اختصاصی قلبی شامل اکترینین-آلفا، زنجیره سنگین میوزین و کانکسین-۴۳ با روش RT-PCR در پایان هفته‌های اول تا پنجم پس از القا و همچنین بیان پروتئین‌های اختصاصی اکترینین-آلفا، تروپونین قلبی و کانکسین-۴۳ در پایان هفته سوم و پنجم پس از القا با روش فلوسایتومتری استفاده شد.

**یافته‌ها:** mRNA ژن‌های مورد بررسی به صورت الگویی وابسته به زمان بیان شدند، به نحوی که mRNA ژن‌های  $\alpha$ -actinin و Connexin-43 در تمام نمونه‌های هفته اول تا پنجم، با روندی صعودی بیان شدند و بیان mRNA ژن MHC در هفته ۴ بیشترین میزان را داشت. میزان بیان پروتئین‌های اکترینین-آلفا و تروپونین قلبی در هفته‌های سوم و پنجم پس از القا با یکدیگر برابر، اما جمعیت سلول‌های بیان‌کننده پروتئین کانکسین-۴۳ از هفته سوم تا پنجم افزایش یافته بود.

**نتیجه‌گیری:** مطالعه حاضر نشان داد که سلول‌های بنیادی مزانشیمی می‌توانند تحت تأثیر 5-aza با غلظت ۵ میکرومول به کاردیومیوسیت تمایز پیدا کنند و با افزایش مدت زمان القا، کاردیومیوسیت‌ها تکوین یافته‌تر می‌شوند.

**کلیدواژه‌ها:** سلول بنیادی مزانشیمی، تمایز، کاردیومیوسیت

آدرس مکاتبه: تهران، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، دانشکده پزشکی، گروه

بیولوژی و علوم تشریح، صندوق پستی: ۱۹۳۹۵-۴۷۱۹

Email: piryae\_a@yahoo.com

مجله علوم تشریح ایران، سال نهم، شماره ۳۶، پاییز ۹۰، صفحات ۱۷۹-۱۹۰

## مقدمه

هر ساله میلیون‌ها انسان دچار سکته قلبی حاد می‌شوند که درصد بالایی از آن منجر به مرگ می‌شود. بسیاری از کسانی که زنده می‌مانند نیز دچار کاهش عملکرد پمپی قلب و کاهش کاردیومیوسیت‌ها می‌شوند. عضله قلب برخلاف عضله اسکلتی فاقد قدرت بازسازی خود بعد از وقوع ضایعات ایسکمیک بوده و مرگ کاردیومیوسیت‌ها در اثر هر عارضه‌ای سرانجام منجر به اختلالات قلبی - عروقی می‌شود [۱-۳]. در حال حاضر تنها راه درمان عملی چنین بیمارانی در شرایط حاد عمل پیوند قلب است که آن هم با مشکلات فراوانی از جمله تعداد بسیار کم قلب‌های اهدایی، عمل جراحی سنگین و هزینه‌بر، مشکلات سرکوب ایمنی شخص گیرنده و احتمال بالای رد پیوند مواجه است [۴]؛ بنابراین یافتن راه‌کار دیگری برای درمان این بیماران، همچون جایگزینی سلول‌های قلبی از اهمیت و ضرورت خاصی برخوردار است. بدین منظور می‌توان از پیوند سلول‌های قلبی خاص به ناحیه دچار سکته قلبی استفاده کرد که فعالیت انقباضی را با جایگزینی سلول‌های قلبی از دست رفته در اثر انفارکتوس افزایش می‌دهند. بدین ترتیب شناسایی انواع سلول‌هایی که بتوانند جایگزین کاردیومیوسیت‌های آسیب دیده شوند یکی از موضوعات مورد توجه محققین بیولوژی و علوم پزشکی است. زیرا با جایگزین کردن این سلول‌های از دست رفته با سلول‌های عملکردی جدید می‌توان فعالیت قلب را بهبود بخشید [۵-۷]. محققین بسیاری در سراسر دنیا در این زمینه مطالعات فراوانی را انجام داده‌اند و می‌توان گفت انواع وسیعی از سلول‌ها برای درمان امتحان شده‌اند. از جمله این سلول‌ها می‌توان به کاردیومیوسیت‌های جنینی و نوزادی، کاردیومیوسیت‌های مشتق از سلول‌های بنیادی جنینی و بالغ، سلول‌های عضله صاف، فیبروبلاست و میوبلاست‌های اسکلتی اشاره نمود [۸-۱۰]. مطالعات مختلف نشان داده‌اند که کاربرد سلول‌های بنیادی در درمان بیماران قلبی همواره نتایج مطلوبی هرچند ضعیف داشته است. بدین منظور دو گروه اصلی

سلول‌های بنیادی که شامل سلول‌های بنیادی جنینی و سلول‌های بنیادی بالغین بوده با روش‌های مختلف به کار برده شده است. از میان سلول‌های بنیادی بالغین، سلول‌های بنیادی مغز استخوان بیش از همه مطالعه شده‌اند، دلیل این امر در دسترس بودن این سلول‌ها و توانایی بالای آن‌ها در تمایز به انواع مختلفی از سلول‌های است [۱۱ و ۱۲]. مطالعات *in vitro* متعددی نشان داده‌اند که MSC‌های مغز استخوان قابلیت تمایز به سلول‌های قلبی را در محیط آزمایشگاه دارند [۱۳ و ۱۴]. متأسفانه در حال حاضر منابع سلولی قابل پیوند محدودی به منظور جایگزینی سلول‌های از دست رفته بعد از انفارکتوس وجود دارد، برخلاف آنچه سابق بر این تصور می‌شد گزارش‌های اخیر نشان‌گر این است که سلول‌های بنیادی مشتق از مغز استخوان به‌دنبال پیوند به قلب به کاردیومیوسیت‌ها تمایز نمی‌یابند [۱۵]. ژانگ (Zhang) و همکارانش در سال ۲۰۰۷ و کویی (Cui) و همکارانش در سال ۲۰۱۰ نشان دادند در صورتی که سلول‌های بنیادی مزانشیمی در شرایط آزمایشگاهی به سمت رده کاردیومیوسیتی تمایز داده شوند، بعد از تزریق به محل سکته قلبی با احتمال بیشتری به کاردیومیوسیت‌ها تمایز می‌یابند و باعث بهبود عملکرد قلب می‌شوند [۱۶ و ۱۷]. از آنجا که بسیاری از روش‌های تمایز کاردیومیوسیتی منجر به ایجاد کاردیومیوسیت‌ها در مقادیر و کارایی کم می‌شوند، بنابراین بهینه‌سازی تولید کاردیومیوسیت‌ها از سلول‌های بنیادی در شرایط آزمایشگاهی بسیار لازم است [۱۸]. همچنین با توجه به آن‌که تعداد سلول‌های تمایز یافته قلبی پیوندی اثر مهمی در موفقیت نهایی پیوند سلول دارد، با اصلاح استراتژی‌های احتمالی که باعث افزایش میزان تبدیل سلول‌های تمایز نیافته به پیش سازهای قلبی یا کاردیومیوسیت‌های بالغ می‌شود، می‌توان میزان موفقیت را افزایش داد. یکی از فاکتورهایی که تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی انسانی را به کاردیومیوسیت تحریک می‌کند azacytidine 5- است [۱۸ و ۱۹] که اثر آن بر تمایز به

### اثبات مزانشیمی بودن سلول‌ها

برای اثبات مزانشیمی بودن سلول‌های مورد استفاده در تحقیق، بیان پروتئین‌های اختصاصی سلول‌های مزانشیمی توسط روش فلوسیتومتری بررسی شد. برای این منظور سلول‌ها با استفاده از تریپسین از کف فلاسک جدا شده و پس از شستشو با بافر فسفات سالین (PBS) توسط پارافرمالدئید ۴ درصد تثبیت شده و در محلول PBS-Tween ۰/۰۵ درصد شناور شدند. برای بلوکه شدن نشانگرهای غیر اختصاصی، سلول‌ها به مدت ۲۰ دقیقه در محلول Blocking قرار گرفته و سپس برای مدت ۱/۵ ساعت با آنتی بادی‌های اولیه CD44 و CD45 کونژوگه با FITC و آنتی بادی‌های CD90 و CD34 کونژوگه با PE انکوبه شدند. سرانجام نتایج با استفاده از دستگاه Becton Dickenson و نرم افزار WinMDI تجزیه و تحلیل شد.

### تمایز سلول‌های مزانشیمی به عضله قلبی

برای تمایز سلول‌های مزانشیمی به کاردیومیوسیت‌ها، سلول‌های مزانشیمی در پلیت‌های ۶ خانه‌ای کشت داده شدند. به این صورت که در هر پلیت سلول‌ها با تراکم یک میلیون سلول کشت داده شده و پس از آنکه سلول‌ها کف خانه‌ها را به طور کامل پر نمودند، مرحله تمایز سلول‌ها آغاز شد. برای القای تمایز سلول‌ها، به مدت ۲۴ ساعت به آن‌ها محیط کشتی اضافه شد که علاوه بر ۱۵ درصد FBS و ۱۰۰ واحد بین‌المللی در میلی‌لیتر پنی‌سیلین/استرپتومایسین، حاوی ۵ میکرومول 5-aza بود. سلول‌ها بعد از گذشت این زمان شستشو داده شد و به مدت ۲۴ ساعت در معرض محیط کشتی قرار گرفتند که فاقد 5-aza بود. این روند تعویض محیط کشت به‌طور متوالی (۲۴ ساعت در معرض 5-aza و ۲۴ ساعت بدون آن) تا زمان نمونه‌برداری برای انجام آزمایش‌ها ادامه یافت.

### بررسی روند تمایز سلول‌ها با روش RT-PCR

برای مقایسه الگو و میزان بیان ژن‌های اختصاصی بافت قلب در سلول‌های در حال تمایز، شاخص‌های تمایز قلبی شامل اکتینین آلفا (Alfa-actinin)، زنجیره سنگین میووزین

کاردیومیوسیت وابسته به زمان و غلظت است. بنابراین تغییر در غلظت و زمان و آثار ترکیبی فاکتورهای کاردیوژنیک بالقوه، بر نتیجه حاصل اثر مهمی خواهد داشت [۱۹]. اگرچه تمایز کاردیومیوسیت‌ها در محیط آزمایشگاهی انجام می‌شود، اما همچنان این سلول‌ها در کسب خصوصیات کاردیومیوسیت‌های بالغ دچار نقص هستند. بنابراین شناخت روند تمایز و بلوغ کاردیومیوسیت‌های تولید شده در شرایط آزمایشگاهی که در دسترس محققان و جامعه بالینی باشد ضروری و مهم به‌نظر می‌رسد [۲۰]. هدف از مطالعه حاضر بررسی روندی است که MSC‌های مشتق از مغز استخوان طی تمایز به کاردیومیوسیت‌ها در محیط آزمایشگاه طی می‌نمایند و به دنبال آن شناخت زمانی که این سلول‌ها از نظر فنوتیپی به سلول‌های شبه کاردیومیوسیتی تبدیل می‌شوند. مسلماً با شناخت بهتر فرایند و زمان تمایز می‌توان با انتخاب مرحله تمایزی خاصی برای پیوندهای سلولی به مدل‌های حیوانی آسیب‌های قلبی یا سلول درمانی بیماران قلبی انتظار وقوع نتایج مؤثرتری را داشته باشیم.

## مواد و روش‌ها

### تهیه سلول مزانشیمی، تخلیص و تکثیر آن‌ها

سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان، از سلول‌های مغز استخوان افراد اهدا کننده‌ای که در بانک سلولی مرکز تحقیقاتی بن یاخته موجود بود، تهیه شد. این سلول‌ها درون فلاسک‌های حاوی محیط کشت DMEM به اضافه ۱۵ درصد FBS و ۱۰۰ واحد بین‌المللی در میلی‌لیتر پنی‌سیلین/استرپتومایسین در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و در غلظت ۵ درصد دی‌اکسید کربن کشت داده شدند. محیط کشت فلاسک‌ها هر سه روز تعویض شد و پس از آنکه ۸۰ تا ۹۰ درصد کف فلاسک‌ها با سلول پر شد سلول‌ها به نسبت ۱ به ۳ پاساژ داده شدند. سرانجام پس از تخلیص و ازدیاد سلول‌های مزانشیمی، از سلول‌های پاساژ ۴ برای انجام مراحل بعدی تحقیق استفاده شد.

جدول ۱. مشخصات پرایمرهای مورد استفاده در PCR

| Genes             | Primer sequences                                                       | Length (bp) | Gene bank code |
|-------------------|------------------------------------------------------------------------|-------------|----------------|
| $\alpha$ -actinin | F 5' tgttgagtgatccgcgcacaa 3'<br>R 5' catcctgcctcagaggcatgaa 3'        | ۲۲۳         | NM 001130005.1 |
| MHC               | F 5' gcacagccatgggagattcgga 3'<br>R 5' ctgcatcactcggctcgcga 3'         | ۲۰۶         | NM 000257.2    |
| Connexin 43       | F 5' agcgcttaggcaaaactcctt 3'<br>R 5' tcttctttcgcatcacataga 3'         | ۲۹۸         | NM 000165.3    |
| GAPDH             | F 5' tattggcgctggtcaccagggtct 3'<br>R 5' ggtcatgagtccttcacgacgatacc 3' | ۴۸۹         | NM 002046.3    |

۸۰ درصد کف ظروف کشت را پر می‌نمایند نمایی موج را نشان می‌دادند (شکل A ۱).

#### بررسی نشانگرهای اختصاصی مزانشیمی

بررسی CD-Markerهای اختصاصی سلول‌های مزانشیمی در سلول‌های پاساژ چهارم با استفاده از فلوسایتومتری نشان داد که به‌طور میانگین ۹۲/۱ درصد این سلول‌ها نشانگر CD44 و حدود ۹۵/۷۵ درصد آن‌ها نشانگر CD90 را بیان می‌کنند. درحالی‌که همین سلول‌ها تقریباً نشانگرهای اختصاصی سلول‌های بنیادی هماتوپویتیک مانند CD34 و CD45 را بیان نمی‌نمایند (شکل B ۱). بنابراین سلول‌های مورد استفاده در تحقیق حاضر سلول‌های بنیادی مزانشیمی هستند.

#### ارزیابی سلول‌های تمایز یافته با روش RT-PCR

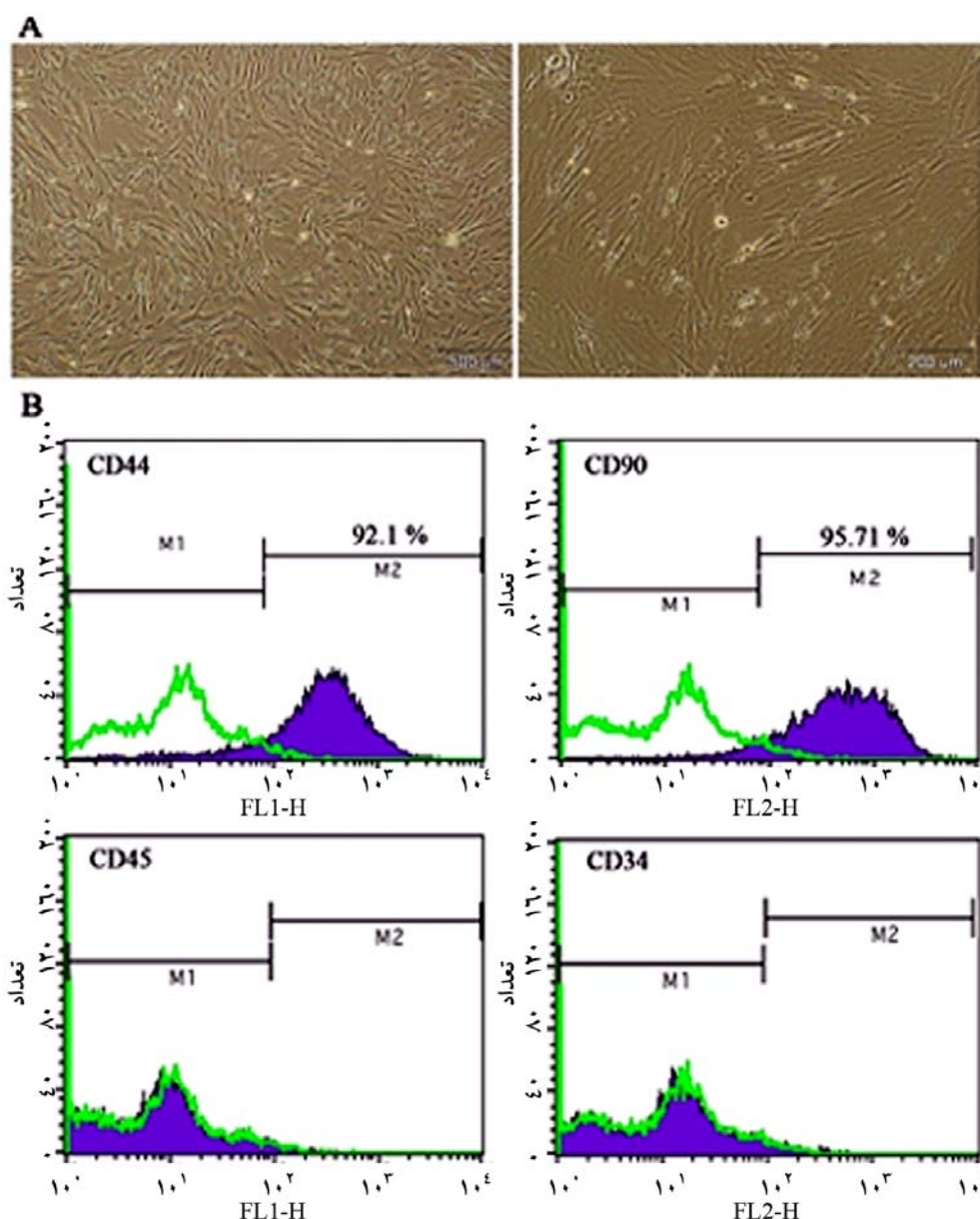
نتایج حاصل از این روش نشان داد که سلول‌های مزانشیمی تحت القای 5-aza قادر به بیان ژن‌های اختصاصی قلبی هستند. به نحوی که mRNAهای ژن‌های  $\alpha$ -actinin و Connexin-43 در تمام نمونه‌های هفته اول تا پنجم با روندی صعودی بیان شد در حالی که mRNAهای ژن MHC در هفته‌های ۲ و ۴ نسبت به سایر هفته‌ها بیان بیشتری را نشان می‌داد. در واقع ژن MHC بیشترین میزان بیان خود را در هفته ۴ داشت و بیان آن در هفته ۵ نسبت به هفته ۴ و نیز در هفته ۳ نسبت به هفته ۲ قدری کاهش یافته بود. در نتیجه به نظر می‌رسد

(MHC) و کانکسین-۴۳ (Connexin-43) در روز صفر (به عنوان کنترل) و پایان هفته‌های اول تا پنجم پس از القا بررسی شد. همچنین از ژن GAPDH به عنوان کنترل داخلی استفاده شد. برای این منظور در هر مورد حدود ۵۰۰ هزار تا ۱ میلیون از سلول‌ها توسط PBS شسته و توسط بافر RNase<sup>plus</sup> لیز شدند. کل RNA سلول‌ها با این روش استخراج شده و با استفاده از پرایمر Oligo dt و آنزیم نسخه‌بردار معکوس MMULV رشته مکمل cDNA ساخته شد. سپس واکنش PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی (جدول ۱)، در حجم ۳۰ میکرولیتر و در ۲۵ تا ۳۰ سیکل انجام شد. سرانجام محصولات PCR به دست آمده روی ژل آگارز ۲ درصد الکتروفورز شد و تصاویر ژل‌ها با استفاده از دستگاه UV – Transilluminator در حضور سایبرگرین و تحت تابش نور UV تهیه شد. برای مقایسه نیمه کمی بیان ژن‌های مورد بررسی در زمان‌های مورد نظر از ژن GAPDH به عنوان کنترل استفاده شد و میزان بیان ژن‌ها نسبت به روز صفر (سلول مزانشیم پاساژ ۴) محاسبه شد. در ضمن از بافت قلبی نیز به عنوان نمونه کنترل مثبت استفاده شد.

#### یافته‌ها

##### خصوصیات ظاهری سلول‌های بنیادی مزانشیمی

مشاهده سلول‌ها با استفاده از میکروسکوپ نوری نشان داد که سلول‌های بنیادی مزانشیمی سلول‌هایی دوکی شکل و شبیه به فیبروبلاست هستند و پس از خالص شدن هنگامی که



شکل ۱. تصاویر میکروسکوپ نوری (A) و نمودارهای فلوسیتومتری بررسی CD-Marker های (B) سلول های مزانشیمی با ساز چهارم، که برای القای تمایز به سلول های قلبی استفاده شدند.

۲ نسبت به هفته ۱ افزایش معنی داری را نشان داد اما مجدداً در هفته ۳ کاهش یافته و سرانجام در هفته ۴ به بیشترین میزان خود رسید، ضمن آن که در هفته ۵ مجدداً قدری کاهش یافت. از طرفی هر چند که میزان بیان ژن connexin-43 در هفته های ۱ و ۲ با یکدیگر تفاوت معنی داری نداشت، اما از هفته سوم به بعد روند افزایش آن شروع شد به نحوی که بیشترین میزان بیان آن در هفته ۵ مشاهده شد (شکل ۲B).

میزان بیان این ژن در مطالعه حاضر روند یکنواختی را طی نمی کند (شکل ۲A). مقایسه نیمه کمی میزان بیان این ژن ها طی روند تمایز نیز روند ذکر شده را تأیید می نماید. نتایج حاصل از آنالیز آماری میزان بیان ژن Alfa-actinin نشان داد که میزان بیان این ژن از هفته اول تا سوم افزایش می یابد اما پس از آن به حالت ثابتی می رسد به گونه ای که اختلاف معنی داری بین هفته های ۳، ۴ و ۵ دیده نشد. هر چند که میزان بیان ژن MHC در هفته

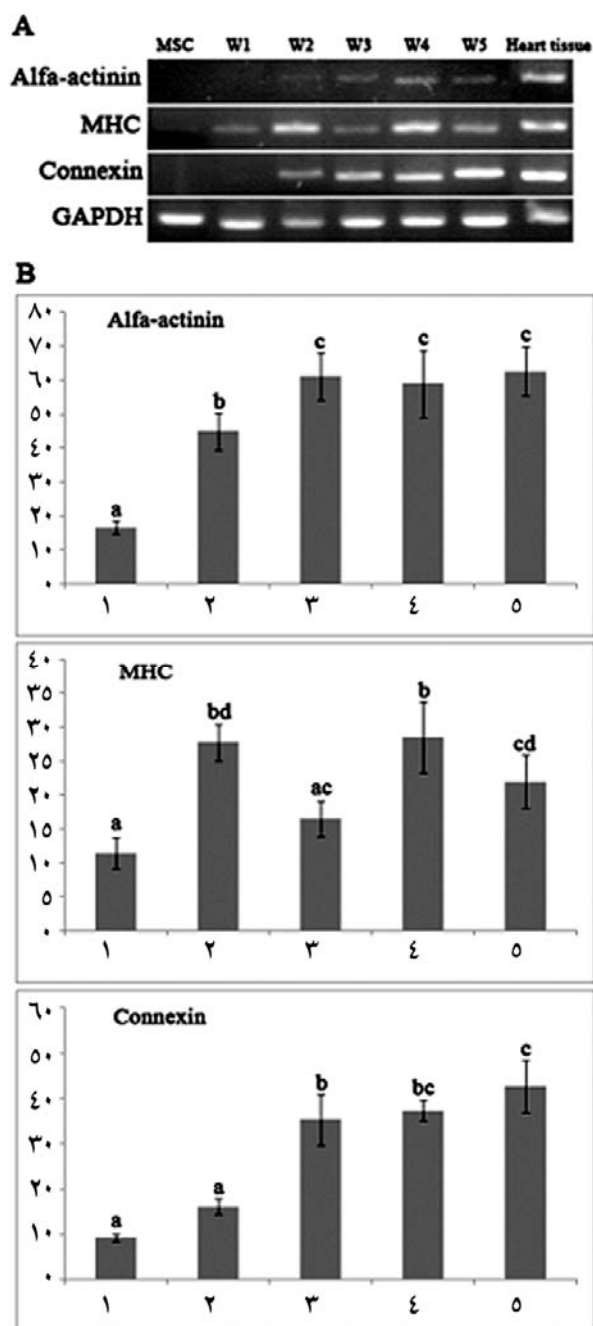
### بیان پروتئین‌های اختصاصی طی تمایز سلول‌ها

برای تأیید بیشتر تمایز سلول‌های بنیادی به سلول‌های شبه کاردیومیوسیتی از روش فلوسیتومتری استفاده شد تا بیان پروتئین‌های اختصاصی بافت قلبی از جمله  $\alpha$ -actinin، troponin و connexin-43 ارزیابی شود. نتایج حاصل نشان داد که ۹۳/۹۳ درصد سلول‌های مورد مطالعه در هفته سوم بعد از اولین القای پروتئین  $\alpha$ -actinin، ۲۸/۳۱ درصد سلول‌ها troponin و ۱۰/۹۳ درصد آن‌ها connexin-43 را بیان می‌نمایند. از طرفی این سلول‌های تمایز یافته در هفته پنجم نیز به ترتیب ۹۵/۱ درصد  $\alpha$ -actinin، ۳۰/۳۳ درصد troponin و ۱۶/۵ درصد connexin-43 را بیان می‌کردند. بنابراین به نظر می‌رسد که هرچند میزان بیان  $\alpha$ -actinin و troponin در این زمان‌ها با یکدیگر برابر است، اما جمعیت سلول‌های بیان‌کننده پروتئین connexin-43 از هفته سوم تا پنجم افزایش یافته است (شکل ۳).

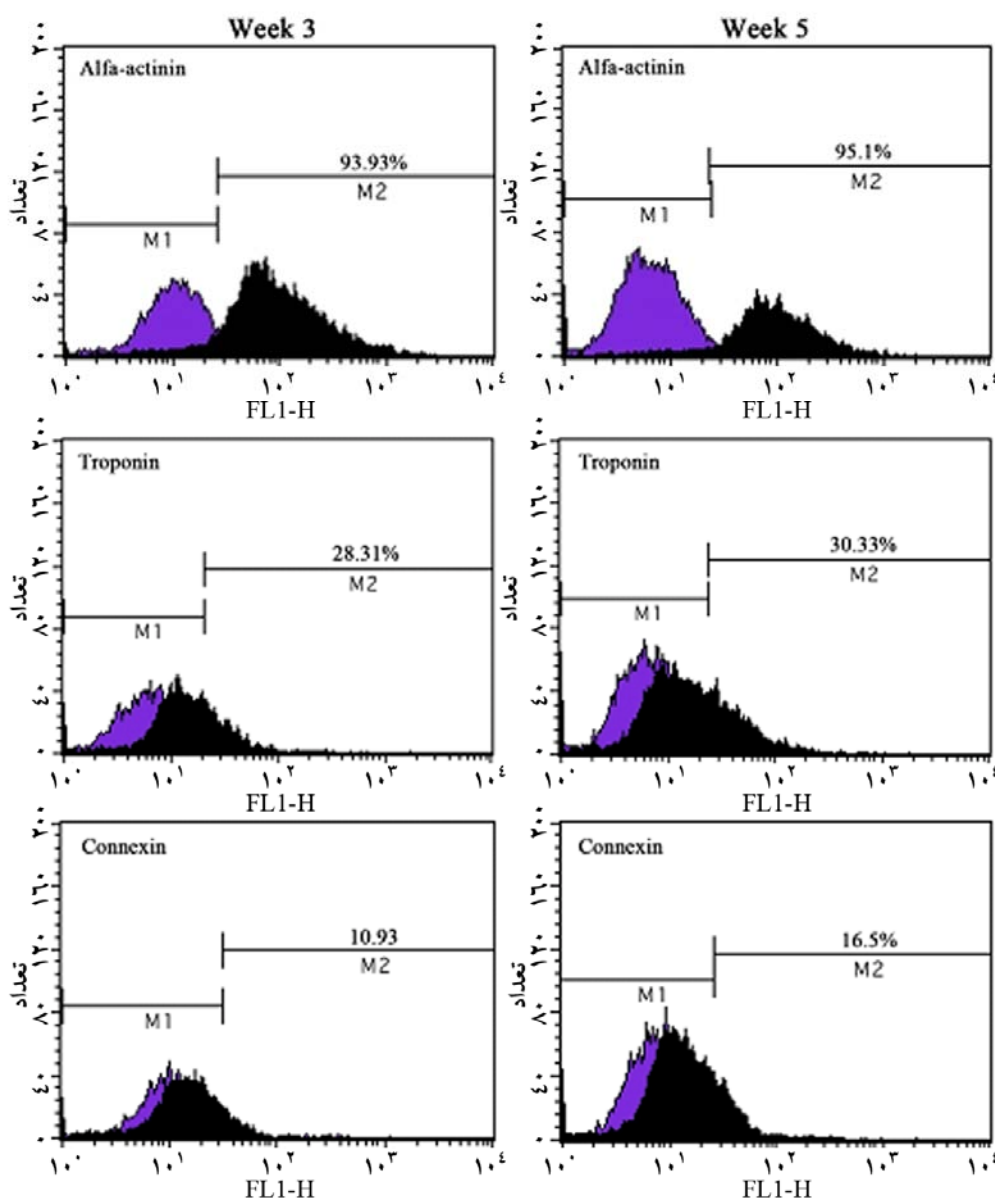
### بحث

با وجود یافته‌های ضد و نقیض در خصوص تمایز سلول‌های بنیادی مغز استخوان به عضله قلبی، مطالعات بالینی متعددی کارآیی آن را در پیشگیری از اتساع بطن چپ و اختلال عملکردی ناشی از تجدید قلب (remodeling) متعاقب MI به اثبات رسانده‌اند [۲۱]. هرچند مکانیسم دقیق ترمیم هنوز نامشخص است اما پیشنهاد می‌شود که تشکیل مجدد کاردیومیوسیت‌ها به وسیله پیوند سلول‌های بنیادی، یکی از فاکتورهای شرکت‌کننده در ترمیم ضایعات قلبی است [۲۲].

مطالعات مختلف پیشنهاد می‌کند که سلول‌های بنیادی مزانشیمی متعدّد شده به سمت سلول‌های کاردیوژنیک برای ایده‌آل کردن میزان ترمیم بعد از پیوند این سلول‌ها به قلب آسیب دیده ضروری است. بنابراین یافتن راه‌کاری برای افزایش میزان تمایز سلول‌ها و نیز پی بردن به زمان دقیق تعهد سلولی و شروع تمایز نسبی آن‌ها به‌طوری که بتوانند سلول‌هایی ایجاد کنند که نشانگرهای اختصاصی بافت قلب را



شکل ۲. تصویر ژل الکتروفورز محصول RT-PCR که باندها را نشان می‌دهد (A) و نمودارهای بیان نسبی ژن‌های اختصاصی قلبی (B) در مراحل مختلف تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی به عضله قلبی. حروف یکسان روی نمودارها نشان دهنده عدم تفاوت معنی‌داری است. نمودارها به صورت  $\text{Mean} \pm \text{SD}$  رسم شده‌اند و سطح معنی‌دار بودن اختلاف‌ها  $p \leq 0.05$  در نظر گرفته شده است. محور افقی هفته‌های تمایز را نشان می‌دهد.



شکل ۳. نمودارهای فلوسیتومتری بیان پروتئین‌های  $\alpha$ -actinin، troponin و connexin-43 در هفته‌های ۳ و ۵ پس از تمایز سلول‌های مزانشیمی

بیان نمایند، مهم است. اولین مرحله در متعهد کردن سلول‌های بنیادی مزانشیمی برای بیان نشانگرهای اختصاصی، قرار دادن این سلول‌ها در شرایطی است که این سلول‌ها را به سمت تمایز پیش ببرد [۲۳]. در مطالعه حاضر برای تغییر شرایط محیط کشت از ماده شیمیایی

5-azacytidine استفاده شد. نتایج نشان می‌دهد وقتی که سلول‌ها در حضور 5-aza انکوبه شوند به سلول‌های شبه کاردیومیوسیتی تمایز می‌یابند [۲۴]. تومیتا (Tomita) و همکاران گزارش کردند که غلظت ایده‌آل برای تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی به کاردیومیوسیت‌ها ۱۰



درمانی دست یافت. به گونه‌ای که سلول‌های حاصل شباهت بیشتری به کاردیومیوسیت‌های بالغ داشته باشند و همچنین درصد بیشتری از سلول‌های بنیادی به سلول‌های شبه کاردیومیوسیتی تمایز یابند.

نتایج حاصل از بررسی حاضر نشان داد که سلول‌های مزانشیمی تحت القای متوالی با 5-aza قادر به بیان ژن‌های اختصاصی قلبی هستند. به نحوی که mRNAهای ژن‌های Alfa-actinin و Connexin-43 در تمام نمونه‌های هفته اول تا پنجم با روندی صعودی بیان شد و بیان mRNA های ژن MHC در هفته ۴ بیشترین میزان را داشت.

بررسی دیگری که می‌تواند مشخص کند آیا سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان انسان به کاردیومیوسیت‌ها تمایز یافته‌اند و بنابراین قابل استفاده در ترمیم قلب هستند این است که تعدادی از پروتئین‌های اختصاصی بافت قلب در این سلول‌ها بیان شوند [۲۳]. تروپونین قلبی و  $\alpha$ -actinin پروتئین‌هایی هستند که نشان دهنده تمایز اولیه سلول‌ها به سمت کاردیومیوسیت‌ها است. از طرفی پیشنهاد شده که کاردیومیوسیت‌های بالغ بعد از تمایز بیشتر، برای عملکرد الکتروفیزیولوژیکی بهتر بایستی با کاردیومیوسیت‌های مجاور ارتباط برقرار نمایند و برای ایجاد این ارتباط پروتئین connexin-43 در مراحل پیشرفته‌تر تمایز سلول‌های بنیادی به کاردیومیوسیت‌ها بیان می‌شود [۲۲]. به همین دلیل در این مطالعه بررسی بیان پروتئین‌های اختصاصی برای تأیید بیشتر تمایز سلول‌های بنیادی به سلول‌های شبه کاردیومیوسیتی با فلوسایتومتری انجام شد. بدین منظور بیان پروتئین‌های تروپونین قلبی،  $\alpha$ -actinin و connexin-43 در هفته‌های سوم و پنجم بعد از تمایز بررسی شد. نتایج حاصل نشان داد که بیان این پروتئین‌ها نیز به مرور زمان افزایش نشان می‌دهد. به‌ویژه بیان connexin-43 که به‌عنوان نشانگر پیشرفت تمایز مطرح است در هفته ۵ نسبت به هفته ۳ افزایش قابل

میکرومولار برای ۲۴ ساعت است، در حالی که زو (XU) و همکاران ساختارهای سارکومری را در سلول‌های بنیادی مزانشیمی انسان ۲ هفته بعد از تیمار با همین غلظت مشاهده نکردند [۲۵]. بالانا (Balana) و همکاران گزارش نمودند که سلول‌های بنیادی مزانشیمی تحت القا با دوز ۳ میکرومولار 5-aza برای ۲۴ ساعت پروتئین‌های اختصاصی بافت قلبی را بیان نمی‌کنند و به کاردیومیوسیت‌ها متمایز نمی‌شوند [۲۶]. مارتین-رندوم (Martin-Rendom) سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان انسان را برای ۲۴ ساعت تحت تأثیر 5-aza با دوزهای ۳، ۵ و ۱۰ میکرومولار قرار دادند، آن‌ها گزارش کردند که درصد بسیار کمی از سلول‌ها به کاردیومیوسیت‌ها تمایز می‌یابند و این درصد با افزایش دوز 5-aza افزایش می‌یابد. نتایج نهایی این مطالعه نیز نشان داد که درصد بسیار کمی از سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان انسان تحت تأثیر یک بار القا با 5-aza به سلول‌های شبه کاردیومیوسیتی متمایز می‌شوند [۲۷].

در تحقیق حاضر سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان انسان، به شیوه‌ای متوالی، ۲۴ ساعت در محیط کشت حاوی ۵ میکرومولار 5-aza و ۲۴ ساعت در محیط کشت فاقد 5-aza کشت داده شدند و این شیوه تعویض محیط کشت در سراسر آزمایش‌ها حفظ شد.

نکته دیگری که احتمالاً می‌تواند در کمک به بهبود فرایند تمایزی سلول‌ها نقش داشته باشد یافتن چگونگی روند تمایزی سلول‌های بنیادی مزانشیمی به کاردیومیوسیت‌ها و پی بردن به وقایع این روند است. به همین دلیل در مطالعه حاضر بیان شدن ژن‌های اختصاصی بافت قلبی به صورت هفتگی و طی ۵ هفته تمایز بررسی شد تا با مشخص کردن روند تمایزی سلول‌های بنیادی مزانشیمی به کاردیومیوسیت‌ها بتوان به راه‌کاری برای دستیابی به سلول‌هایی مناسب‌تر به منظور استفاده در سلول

قبولی را نشان داد.

بهترین زمان برای پیوند این سلول‌ها را شناسایی نماییم تا انتظار بهبودی بیشتری را در ترمیم ضایعات قلبی داشته باشیم.

### تقدیر و تشکر

مقاله حاضر برگرفته از طرح تحقیقاتی مصوب مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی است. نویسندگان بدین وسیله مراتب تقدیر و تشکر خود را از مسئولین و همکاران این مرکز، به ویژه سرکار خانم نورینا رهبریان به‌خاطر همکاری‌های صمیمانه‌شان ابراز می‌دارند. همچنین از جناب آقای دکتر مسعود سلیمانی و مرکز تحقیقات بن یاخته به‌خاطر اهدای MSC های انسانی و نیز سرکار خانم دکتر نریمان مصفا به‌خاطر کمک‌های علمی شان تقدیر می‌شود.

با توجه به نتایج حاصل از این تحقیق و مقایسه آن با مطالعات دیگر می‌توان چنین نتیجه‌گیری نمود که سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان انسان (به‌عنوان یکی از مهمترین کاندیدها برای سلول درمانی) توانایی تمایز به کاردیومیوسیت‌ها را دارند به‌طوری که روش‌های مختلف مورد استفاده برای تمایز این سلول‌ها توسط محققین متعدد این قابلیت را به اثبات رسانده، اما همواره کیفیت و تعداد سلول‌های تمایز یافته به گونه‌ای نبوده که پاسخ‌گوی ترمیم مناسب قلب باشد. بنابراین برای استفاده مؤثر از این سلول‌های تمایز یافته در سلول درمانی، بایستی روش‌های مختلف تمایزی به صورت *in vitro* ارزیابی شود تا بتوان بهترین شرایط تمایز را ایجاد نموده و به تعداد بیشتری سلول‌های تمایز یافته دست یابیم و علاوه بر آن

### References

1. Li X, Yu X, Lin Q, Deng C, Shan Z, Yang M, et al. Bone marrow mesenchymal stem cells differentiate into functional cardiac phenotypes by cardiac microenvironment. J Mol Cel Cardiol 2007; 42:295–303.
2. Toma C, Pittenger MF, Byrne BJ, Cahill KS, Kessler PD. Human mesenchymal stem cells differentiate to a cardiomyocyte phenotype in the adult murine heart. Circulation 2002; 105: 93-8.
3. Xu W, Zhang X, Qian H, Zhu W, Sun X, Hu J, et al. Mesenchymal stem cells from adult human bone marrow differentiate into a cardiomyocyte phenotype in vitro. Exp Biol Med 2004; 229:623-31.
4. Wollert KC, Drexler H. Clinical applications of stem cells for the heart. Circ Res 2005; 96:151-63.
5. Li XH, Yu XY, Lin QX, Deng CY, Shan ZX, Yang M, et al. Bone marrow mesenchymal stem cells differentiate into functional cardiac phenotypes by cardiac microenvironment. J Mol Cel Cardiol 2007; 42:295–303.
6. Toma C, Pittenger MF, Byrne BJ, Cahill KS, Kessler PD. Human mesenchymal stem cells differentiate to a cardiomyocyte phenotype in the adult murine heart. Circulation 2002; 105:93-8.
7. Xu W, Zhang X, Qian H, Zhu W, Sun X, Hu J, et al. Mesenchymal stem cells from adult human bone marrow differentiate into a cardiomyocyte phenotype in vitro. Exp Biol Med 2004; 229:623-31.
8. Psaltis PJ, Zannettino AC, Worthley SG, Gronthos S. Mesenchymal Stromal Cells: Potential for Cardiovascular Repair. Stem Cells 2008; 26: 2201–10.
9. Xinyun C, Zhi Z, Bin Z, Li R, Yucheng C, Yafei Y, et al. Effects of cardiotrophin-1 on differentiation and maturation of rat bone marrow mesenchymal stem cells induced with

- 5-azacytidine in vitro. *Int J Cardiol* 2010; 143:171-7.
10. **Tao ZW, Li LG.** Cell therapy in congestive heart failure. *J Zhejiang Univ Sci* 2007; 8: 647-60.
11. **Burt RK, Loh Y, Pearce W, Beohar N, G. Barr W, Craig R, et al.** Clinical Applications of Blood-Derived and Marrow-Derived Stem Cells for Nonmalignant Diseases. *JAMA* 2008; 299: 925-36.
12. **Zeidan-Chulia F, Noda M.** Opening the mesenchymal stem cell tool box. *Eur J Dent* 2009; 3: 240-9.
13. **Zhang FB, Li L, Fang B, Zhu DL, Yang HT, Gao PJ.** Passage-restricted differentiation potential of mesenchymal stem cells into cardiomyocyte-like cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 336 :784-92.
14. **Zhang Y, Chu Y, Shen W, Dou Z.** Effect of 5-azacytidine induction duration on differentiation of human first-trimester fetal mesenchymal stem cells towards cardiomyocyte-like cells. *Interact Cardio Vasc Thorac Surg* 2009; 9: 943-6.
15. **Shin M , Ishii O, Sueda T, Vacanti JP.** Contractile cardiac grafts using a novel nanofibrous mesh. *Biomaterials* 2004; 25: 3717-23.
16. **Zhang GT, Tan YZ, Wang HJ, Ao H, Guo HD, Huang GY.** Effects of marrow- derived cardiac stem cell transplantation after myocardial infarction in rats. *Zhonghua xin xue Guan Bing Za Zhi*, 2007; 35: 940-4.
17. **Cui XJ, Wang HJ, Guo H, Wang C, Ao H, Liu X, et al.** Transplantation of mesenchymal stem cells preconditioned with diazoxide, a mitochondrial ATP- sensitive potassium channel opener, promotes repair of myocardial infarction in rats. *Tohoku J Exp Med* 2010; 220:139-47.
18. **Cai CL, Liang X, Shi Y, Chu PH, Pfaff SL, Chen J, et al.** Isl1 identifies a cardiac progenitor population that proliferates prior to differentiation and contributes a majority of cells to the heart. *Dev Cell* 2003; 5:877-89.
19. **Goh G, Self T, Barbadillo Muñoz MD, Hall IP, Young L, Denning C.** Molecular and phenotypic analyses of human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes: opportunities and challenges for clinical translation. *Thromb Haemost* 2005; 94: 728-37.
20. **An RH, Davies MP, Doevendans PA, Kubalak SW, Bangalore R, Chien K.R, et al.** Developmental changes in beta-adrenergic modulation of L-type Ca<sup>2+</sup> channel in embryonic mouse heart. *Circ Res* 1996; 78: 371-8.
21. **Boyle AJ, Schulman SP, Hare JM, Oettgen P.** Is stem cell therapy ready for patients? Stem cell therapy for cardiac repair. Ready for the next step. *Circulation*, 2006; 114: 339-52.
22. **Shim WSN, Jiang Sh, Wong P, Tan J, Chua YL, Tan YS, et al.** Ex vivo differentiation of human adult bone marrow stem cells into cardiomyocyte-like cells, *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 324: 481-8.
23. **Potapova IA, Doronin SV, Kelly DJ, Rosen AB, Schuldt AJ, Lu Z, et al.** Enhanced recovery of mechanical function in the canine heart by seeding an extracellular matrix patch with mesenchymal stem cells committed to a cardiac lineage. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2008; 295:H2257-63
24. **Lodish H, Berk A, Kaiser CA, Krieger M, Scott MP, Bretscher A, et al.** *Molecular Cell Biology*. (6<sup>th</sup> edn). Freeman WH & Company, New York, 2007, p925.
25. **Antonitsis P, Ioannidou-Papagiannaki E, Kaidoglou A, Papakonstantinou Ch.** In vitro cardiomyogenic differentiation of adult human bone marrow mesenchymal stem cells. The role of 5-azacytidine. *Interact Cardio Vasc Thorac Surg* 2007;6:593-7.
26. **Balana B, Nicoletti C, Zahanich I, Graf EM, Christ T, Boxberger S, et al.** 5-Azacytidine induces changes in electrophysiological properties

- of human mesenchymal stem cells. *Cell Res* 2006; 16: 949-60.
27. **Martin-Rendon E, Sweeney D, Lu F, Girdlestone J, Navarrete C, Watt SM.** 5-Azacytidine-treated human mesenchymal stem/progenitor cells derived from umbilical cord, cord blood and bone marrow do not generate cardiomyocytes in vitro at high frequencies. *Vox Sanguinis* 2008; 95: 137-48.