مقاله تحقیقی

تأثیر کاردیوژل و ماتریژل بر فراساختار کاردیومیوسیت‌های مشتق از سلولهای بنیادی جنینی موشی

حسین بهاروند .Ph.D*، مهناز آذرنیا .Ph.D**، کاظم پریور .Ph.D***، سعید کاظمی آشتیانی .Ph.D****

* گروه زیست‌شناسی دانشگاه تربیت معلم و استادیار پژوهشی گروه سلولهای بنیادی پژوهشکده رویان

** استادیار گروه زیست‌شناسی دانشگاه تربیت معلم

*** استاد گروه زیست‌شناسی دانشگاه تربیت معلم

**** استادیار پژوهشی گروه سلولهای بنیادی پژوهشکده رویان

تاریخ وصول: تیر ماه ۸۳، تاریخ پذیرش: شهریور ماه ۸۳

چکیده

هدف: بررسی اثر کاردیوژل و ماتریژل بر فراساختار کاردیومیوسیت‌های مشتق از سلولهای بنیادی جنینی

مواد و روشها: کاردیومیوسیت‌های حاصل از تمایز خودبه‌خود سلولهای بنیادی جنینی رویان B۱ (مشتق از موش نژاد C57BL/6) بر ماده زمینه برون سلولی (ECM: Extracellular Matrix) مشتق از فیبروبلاستهای قلبی (کاردیوژل)، ماده زمینه برون سلولی تجاری (ماتریژل) و گروه کنترل (بدون ECM) تا ۲۱ روز کشت شدند. خصوصیات فراساختار کاردیومیوسیت‌های با میکروسکوپ الکترونی گذاره (TEM: ransmission Electron Microscopy) ارزیابی شدند.

یافته‌ها: بررسی فراساختاری بلوغ کاردیومیوسیت‌ها، وجود میوفیبریلی سازمان یافته همراه با صفحات اینترکاله، لوله‌های T نوارهای Z-، A-، I- و M- را در روز چهاردهم در کاردیومیوسیت‌های کاردیوژلی نشان داد و در روز بیست و یکم کشت در تمام گروهها، ساختارهای فوق بروز کردند.

نتیجه‌گیری: نتایج این مطالعه نشان داد که امکان تولید کاردیومیوسیتهای بالغ (از نظر فراساختاری) از سلولهای بنیادی جنینی وجود دارد و کاردیوژل مشتق از فیبروبلاست قلبی در بلوغ سریعتر فراساختار کاردیومیوسیت‌های مشتق از سلولهای بنیادی جنینی مؤثر است.

کلید واژه‌ها: سلولهای بنیادی جنینی، فراساختار کاردیومیوسیت، کاردیوژل، ماتریژل، ماده زمینه برون سلولی

مقدمه

تلاشهای فراوانی طی دهه‌های گذشته برای مطالعه تکوین کاردیومیوسیت‌های پستانداران در شرایط آزمایشگاهی انجام شده است. یک موضوع مهم در انجام چنین مطالعاتی، حصول منبع نامحدودی از کاردیومیوسیت‌هاست.

سلولهای بنیادی جنینی (ES: Embryonic Stem Cell)، که مشتق از توده سلولی داخلی بلاستوسیست است [۱ و ۲] پتانسیل منبع نامحدود انواع سلولها برای مطالعات زیست‌شناسی تکوینی و از جمله تمایز به کاردیومیوسیت‌ها را دارند. در حقیقت، سلولهای بنیادی جنینی به‌صورت تمایز نیافته و پرتوان[1] هستند به این معنا که می‌توانند به انواع سلولی مشتق از سه لایه زاینده جنینی - اکتودرم، مزودرم و اندودرم - در شرایط آزمایشگاهی و موجود زنده متمایز شوند (برای مرور ر.ش منبع [۳]). نکته دیگر برای مطالعه سلولها و از جمله تمایز کاردیومیوسیت‌ها، ایجاد شرایط مطلوب کشت است. در موجود زنده، سلولهای بنیادی جنینی با انواع ترکیبات محلول و

آدرس مکاتبه: تهران، پژوهشکده رویان، گروه سلولهای بنیادی
صندوق‌پستی ۴۶۴۴-۱۹۳۹۵ Email: Baharvand50@yahoo.com

1. Pluripotent

نامحلول ماده زمینه برون سلولی (ECM) در ارتباط هستند که تمایز آنها را تحت تأثیر قرار می‌دهند. در این مطالعات مشاهده شده است که ترکیبات ECM و فاکتورهای رشد بر تمایز سلولهای بنیادی و صفات فیزیولوژیکی، ساختاری و عملکرد آنها مؤثر است [۴]. نشان داده شده است که ماهیت ECM بر صفات فنوتیپی و ژنوتیپی سلولها مؤثر است [۷-۵]. ترکیب ECM هر اندام متفاوت بوده و بنابراین برهم کنش آن با سلولهایش منحصر به فرد است [۸].

تاکنون کاردیومیوسیت‌های مشتق از سلولهای بنیادی جنینی در ظروف کشت بافتی بر پلاستیک کشت شده‌اند [۱۲-۸]. همچنین کاردیومیوسیت‌های بزرگسالان نیز بر کلاژن‌ها، لامینین یا فیبرونکتین یا ترکیب آنها کشت شده‌اند [۱۲و۱۳]. کاردیومیوسیت‌ها در موجود زنده توسط غشای پایه‌ای شامل کلاژن نوع IV، لامینین، فیبرونکتین و پروتئوگلیکانهای مختلفی احاطه می‌شوند، که این ECM قلبی که توسط فیبروبلاستهای قلبی سنتز می‌شود کاردیوژل نامیده می‌شود [۱۶-۱۴]. از سوی دیگر ECM تجاری به نام ماتریژل وجود دارد که یک غشای پایه محلول است که از سارکومای (Engelbreth-Holm-Swarm) موشی به دست می‌آید. ترکیبات آن شامل لامینین، کلاژن نوع IV، پروتئوگلیکان هپاران سولفات است [۱۷]. در شرایط کشت، ماتریژل پلی‌مر شده و ماده زمینه فعالی را می‌سازد. مطالعه حاضر به بیان تکوین فراساختار کاردیومیوسیت‌های مشتق از سلولهای بنیادی جنینی موشی (رویان B۱) پس از کشت بر کاردیوژل، ماتریژل و کنترل (بدون ECM) می‌پردازد.

مواد و روشها

کشت سلولهای بنیادی جنینی

در این مطالعه از رده سلولهای بنیادی جنینی «رویان B۱» مشتق از موش نژاد C57BL/6 استفاده شد[۱۸]. این سلولها به صورت تمایز نیافته بر فیبروبلاست‌های جنینی موشی که تقسیم آنها با مایتومایسین-C (Sigma, M0503) متوقف شده بود، کشت شدند. محیط کشت این سلولها شامل (DMEM, Duleco's modified Eagle's Medium Gibco, 10829-018) همراه با افزودنیهای ۱۵ درصد سرم جنین گاوی (FCS, Gibco, 16141-079)، ۰/۱mM بتامرکاپتوانول (Sigma, M7522)، ۲mM گلوتامین (Gibco, 15039-027)، ۰/۱mM اسید آمینه غیرضروری (Sigma, M7145) و ۱۰۰۰iu/ml فاکتور ممانعت کننده لوکمیایی (LIF, Chemicon, ESGRO, ESG 1107) بود.

نحوه تمایز کاردیومیوسیت‌ها

کاردیومیوسیتهای ضربان دار به‌صورت خودبه‌خود از سلولهای بنیادی جنینی به روشی که قبلاً بیان شده است تمایز یافتند [۱۹]. به‌طور خلاصه مراحل کار شامل کشت ۸۰۰ سلول بنیادی جنینی در قطرات آویزان ۲۰ میکرولیتری بود تا اجسام شبه جنینی (EB) تشکیل شود. پس از دو روز اجسام شبه جنینی به ظرف باکتریایی منتقل شدند تا پنج روز دیگر رشد یابند.

اجسام شبه جنینی هفت روزه به صورت منفرد در ظروف ۲۴ خانه مجدداً به مدت ۲۱ روز کشت شدند. کف ظرفها با کاردیوژل، ماتریژل یا بدون ECM (گروه کنترل) مفروش شده بودند.

در اجسام شبه جنینی کشت شده، کاردیومیوسیت‌ها به صورت مجموعه‌های سلولی ضربان دار مشاهده شدند.

تهیه کاردیوژل

کاردیوژل با استفاده از روش ون‌وینکل (Van Winkle) و همکاران (۱۹۹۶) و از فیبروبلاستهای قلبی به دست آمد [۱۶]. در این روش قلب نوزادان سه تا چهار روزه موش با استفاده از کلاژناز (Sigma, P-C7661) و پانکراتین (Sigma, P-3232) (با غلظت نهایی: ۷۳ u/ml و ۰/۶mg/ml) به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، همراه با تکانهای نرم هضم شدند. سپس محیط رویی سلولها دور ریخته شد. به دنبال آن ۲۰ دقیقه دیگر هضم آنزیمی انجام و سلولهای حاصل جمع‌آوری شد و محیط کشت DMEM[1] حاوی ۱۵ درصد سرم جنین گاوی به آن اضافه شد. محلول حاصل با دور ۵۰۰g سانتریفوژ و پلت

1. Dulbecco's Modified Eagl's Medium

(pellet) حاصل در محیط کشت مذکور مخلوط شد. مخلوط حاصل روی شیب پرکل (percoll) سانتریفوژ شد. فراکسیون سلولی از بین دانسیته ۱/۰۵ و ۱/۰۶۲ برداشته شده و دوبار در محیط کشت شستشو شد. سلولهای حاصل در پلیت و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و CO_2 ۵ درصد برای یک ساعت و نیم کشت شدند. سپس محلولی رویی حذف شده و سلولهای باقیمانده برای سه تا چهار روز کشت شدند. به‌دنبال پرنمودن ظرف (confluency)، سلولها با محلول بافرفسفات (PBS)[1] بدون Ca^{2+} و Mg^{2+} دوبار شستشو شدند و با محلول (۵۳mM) EDTA / (۰/۰۵ درصد) تریپسین (Gibco, 15405-012) از کف ظرف جدا شدند و به نسبت ۱ به ۳ به پلیتهای کشت دیگر منتقل شدند. سپس فیبروبلاستها با روش اتصال افتراقی (differential selective adhesion) از سایر سلولها جدا شدند، زیرا فیبروبلاستها سریعتر از سایر سلولها به کف ظرف می‌چسبند و پس از یکساعت و نیم کشت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد و CO_2 ۵ درصد محلول رویی حذف می‌شود و محیط جدید اضافه می‌شود.

پس از پرکردن ظرف (confluency)، سلولها به ظرفهای ۲۴ خانه منتقل شدند. وجود سرم (۱۵ درصد) درصد رشد فیبروبلاست‌ها را بهبود می‌بخشد. سه تا چهار روز بعد، فیبروبلاستها با کمک (۰/۵mM) Na_2EDTA (Sigma, E-6758) به مقدار ۰/۵ml به ازای هر خانه به مدت ۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد جدا شدند. سپس هر خانه چندبار با محلول EDTA شسته شد تا سلولها کاملاً حذف شوند. پلیتها با کمک میکروسکوپ اینورت فاز کنتراست (Olympus, CKX41, Japan) به منظور اطمینان از حذف سلولها ارزیابی شدند. با این روش ماده زمینه برون سلولی متصل به کف ظرف باقی ماند.

تهیه ماتریژل

ماتریژل (Sigma, E1270) به آرامی در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد ذوب شد تا ژله‌ای نشود. سپس با DMEM سرد به نسبت یک به سی رقیق شد. هر خانه ظرف ۲۴ خانه با ۲۵۰μl از محلول ماتریژل پوشانده شد بعد از یک الی دو ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، کف ظرف با پلی‌مر ماتریژل مفروش شد. محلول ماتریژل اضافی قبل از استفاده برداشته شد.

میکروسکوپ الکترونی گذاره (TEM)

چهارده و بیست و یک روز بعد از کشت (plating) اجسام شبه جنینی کاردیومیوسیتهای تمایز یافته برای بررسی فراساختاری، پردازش شدند. نمونه‌ها با گلوتارآلدیید ۲ درصد در PBS ۰/۱ مولار (pH=۷/۴) برای دو ساعت تثبیت شدند. بعد از شستشو (۲×۱۵min)، هر نمونه با تترااکسیداسمویم برای ۱/۵ ساعت مجدداً تثبیت شد. سپس نمونه‌ها سه بار (هر بار ۵ دقیقه) در آب شستشو و در سری اتانول (۳۰، ۵۰، ۷۰ و ۹۵ درصد) هر کدام به مدت ۱۵ دقیقه و بعد در اتانول ۱۰۰ درصد سه بار (هر بار ۱۵ دقیقه) آب‌گیری شدند. درون‌روی رزین Spurr با سری رزین: اتانول انجام شد، ۱:۱ (دو ساعت)، ۱۰۰ درصد رزین (دو ساعت) و ۱۰۰ درصد رزین (یک شب) و مجدداً در رزین ۱۰۰ درصد (دو ساعت). به‌دنبال آن نمونه‌ها در مولد (mould) حاوی ۱۰۰ درصد رزین قرار گرفته و در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد برای یک شب پلی‌مر شدند. بعد از پلی‌مر شدن، مقاطع حدود ۸۰nm تهیه و با سیترات سرب و استات اورانیل برای هشت دقیقه رنگ‌آمیزی و با میکروسکوپ (Zeiss EM900) TEM عکسبرداری شد.

یافته‌ها

تمایز سلولهای بنیادی جنینی به کاردیومیوسیتها

قبلا مشخصات مورفولوژی شاخص سلولهای بنیادی جنینی «رویان B1» و پرتوانی[2] آنها در محیط آزمایشگاهی و در موجود زنده نشان داده شده است [۱۸ و ۲۰] تمایز این سلولها با تشکیل جسم شبه جنینی شروع می‌شود. به منظور مشاهده سلولهای ضرباندار، اجسام شبه جنینی به صورت منفرد در هر خانه ظرف ۲۴ خانه کشت می‌شوند. این اجسام به کف ظرف چسبیده و جمعیت ناهمگنی از کاردیومیوسیتها را ساختند.

از آنجا که ظرفیت تمایزی سلولهای تمایز یافته به تعداد اولیه سلولهای بنیادی جنینی در هر جسم شبه جنینی بستگی

1. Phosphate Buffered Saline
2. Pluripotency

دارد [۲۱ و ۲۲]. تعداد مشخصی از سلول بنیادی جنینی رویان B1 در هر قطره آویزان گذاشته شد. حداقل مقدار سلول ۴۰۰ سلول در هر قطره بود و درصد بیشتری با ۸۰۰ سلول در هر قطره به‌دست آمد [۱۹]. بنابراین ۸۰۰ سلول در هر قطره کشت شد تا جسم شبه جنینی ایجاد شود.

فراساختار کاردیومیوسیتهای مشتق از سلولهای بنیادی جنینی

فراساختار کاردیومیوسیتهای تمایز یافته در روز ۱۴+۷ و ۲۱+۷ نشان داد که سلولها با هسته‌ای تک، بزرگ و گرد تا کشیده هستند. ظاهر هسته‌ها هتروکروماتین بود و نواحی هتروکروماتین در محیط دیده شد (شکلهای ۳A,۲A,۱E,۱C,۱A). در روز ۱۴+۷، کاردیومیوسیتهای تمایز یافته دارای اندامکهای تمایز یافته بودند (شکل ۱). یک خصوصیت مهم میوکاردیومها در این مرحله از تکوین، حضور میوفیبریلهای سازمان یافته و طویل بود. در تمام گروهها، نظیر کاردیوژنز در موجود زنده [۲۳ و ۲۴].کاردیومیوسیتهای مجاور درجات مختلفی از سازماندهی میوفیبریلی و تمایز را نشان می‌دادند. علاوه بر این در یک سلول هم، مراحل متفاوتی از بازسازی میوفیبریلی مشاهده شد و سارکومرهای با بازسازی میوفیبریلی متفاوت همزمان در یک سلول وجود داشت. سازمان‌بندی فضای فیلامنتهای نازک (اکتین) و ضخیم (میوزین) در قالب نوارهای I- و A- مشخص بود (شکل ۱E). علاوه بر این فیلامنتهای نازک (اکتین) و ضخیم (میوزین) آرایش شش وجهی داشتند که در مقاطع عرضی مشهود بود. در مقاطع طولی بیشتر فیبریلها به موازات محور بلند سلول بودند. فیبریلهای منفرد به صورت گروهی در بعضی سلولها در این مرحله و به خصوص در کاردیومیوسیتهای رشد یافته بر کاردیوژل دیده شدند (شکلهای ۱A و ۱B).

در حالی که فیبریلهای سازمان یافته به طور مشخصی در بیشتر کاردیومیوسیتها در هر سه گروه دیده می‌شدند، در بعضی سلولهای دیگر میوفیلامنتهای منفرد سازمان نیافته با آرایش تصادفی قابل مشاهده بودند.

در کاردیومیوسیتهای تمایز یافته ۲۱+۷ تمام گروهها، میوفیلامنتها به صورت فیبریل سازمان یافته بودند (شکل ۴-۲). این فیبریلها به فراوانی و به صورت منفرد یا گروهی در طول سلول دیده می‌شدند. گاه چندین فیبریل به صورت یک توده قابل مشاهده بودند. بررسی مقاطع طولی و عرضی کاردیومیوسیتهای ۲۱+۷ روزه در تمام گروهها نشان داد که حجم و تعداد میوفیبریلها در مقایسه با کاردیومیوسیتهای ۱۴+۷ روزه بیشتر شده است. میوفیبریلها متراکم و بسیاری از آنها، دارای نوارهای A-,I-, Z- هستند (شکلهای ۲B ، ۳A و ۴B). این ساختارها در کاردیومیوسیتهای ۱۴+۷ روزه قابل مشاهده هستند. فاصله بین دو خط Z حدود ۲μM است. فیلامنتهای نازک و ضخیم به خوبی در کاردیومیوسیتهای ۲۱+۷ روزه مشخص است و آرایش فضای شش وجهی دارند (شکلهای ۲C ، ۳B و ۴B). نوارهای H- و M- در کاردیومیوسیتهای ۱۴+۷ روزه بر کاردیوژل مشخص هستند (شکلهای ۲B و ۲A) اما این ساختارها بر کاردیومیوسیتهای مزبور رشد یافته بر ماتریژل یا کنترل دیده نشدند. در مقابل، کاردیومیوسیتهای ۲۱+۷ روزه در گروههای کاردیوژلی یا کنترلی دارای نوارهای H-, M- فراوانی بودند (شکلهای ۲B ، ۳A و ۴A). لوله‌های T و سارکوم پلاسمیک رتیکولوم در کاردیومیوسیتهای ۲۱+۷ روزه گروههای کنترل و کاردیوژل دیده شد (شکلهای ۲C و ۲B)، اما در روز ۱۴+۷ لوله‌های T تنها در کاردیومیوسیتهای کاردیوژلی دیده شد (شکل ۱A).

فضاهای بین فیبریلی به خصوص در کاردیومیوسیتهای ۲۱+۷ روزه با ردیفهایی از میتوکندریهایی که در جهت فیبریلها بودند، اشغال شده بود. میتوکندریها به صورت گرد تا کشیده و با ظاهر روشن و با کریستاهای عرضی کم تا زیاد بودند. ظاهر کریستاها تیغه‌ای (lamellar)، طویل و متراکم بود که نمایانگر فعالیت متابولیکی سلول بود و در نتیجه فضاهای بین کریستایی ظاهری متراکم به خصوص در کاردیومیوسیتهای ۲۱+۷ روزه کاردیوژلی بود. از روز چهارده تا روز بیست ویک، و به خصوص در کاردیومیوسیتهای کاردیوژلی به نظر می‌آید که تعداد و اندازه میتوکندریها بیشتر شده و کریستاهای آنها متراکم و طویل‌تر شده است.

اتصالات باز، دسموزومها و اتصالات چسباننده[1] در بین بسیاری از کاردیومیوسیتها مشاهده شد که نشانگر وجود صفحات اینترکاله است (شکلهای 2B، 3B و 4B). علاوه بر این، توبولهای سارکوپلاسمیک رتیکولوم از روز چهارده به بیست و یک افزایش یافت (شکلهای 2C و 3C). تماس سارکوپلاسمیک رتیکولوم و میتوکندریها در کاردیومیوسیتهای کاردیوژلی نسبتاً فراوان بود. در بعضی کاردیومیوسیتها دستگاه گلژی به صورت سیسترناهای پهن (flat) در نزدیکی هسته دیده شدند (شکلهای 1A و 1C) سیتوپلاسم غنی از ریبوزوم و پلی‌زوم بود. گرانولهای حاوی فاکتور ناتری یورتیک ANF[2] در کاردیومیوسیتهای چهارده وبیست و یک روز دیده شد.

تجمع فراوانی از گلیکوژن، به خصوص در کاردیومیوسیتهای ماتریژلی وجود داشت. قطرات لیپیدی در سیتوپلاسم به صورت انکلوژن‌های اسموفیلی در کاردیومیوسیتهای ۲۱+۷ روزه تمام گروهها دیده شد. قطرات لیپیدی غنی از اسیدهای چرب ظاهری خاکستری داشتند (شکل 4C). میزان تیرگی قطرات با میزان اشباع‌تری گلیسریدها ارتباط دارد.

بحث

کاربرد بالقوه کاردیومیوسیتهای مشتق از سلولهای بنیادی جنینی، به طورعمده به تولید شرایط مطلوب کشت برمی‌گردد. در تحقیق حاضر خصوصیات فراساختاری کاردیومیوسیتهای مشتق از سلولهای بنیادی جنینی که بر کاردیوژل و ماتریژل کشت شدند، بیان شد. در واقع کاردیوژل و ماتریژل به ترتیب ماده زمینه برون‌سلولی مشتق از فیبروبلاستهای قلبی و سارکوما هستند.

بررسی فراساختاری کاردیومیوسیتهای تمایز یافته وجود هسته‌ای گرد یا کشیده را نشان داد. این سلولها دارای درجات متفاوتی از سازمان‌بندی دسته‌جات میوفیبریلی بودند و صفحات اینترکاله، لوله‌های T و نوارهای M, H, I, Z مشاهده شدند. مطالعات قبلی نشان داد که طی کاردیوژنز در موجود زنده، در ابتدا میوفیبریلها پراکنده هستند و آرایش نامنظمی دارند. به تدریج با بلوغ بیشتر میوفیبریلها آرایش موازی یافته و در نهایت ساختار سارکومری می‌یابند[۲۴،۲۳].

لوله‌های T، نوارهای M و H در بعضی سلولها در تمام گروهها در روز ۲۱+۷ مشاهده شدند. اما در روز ۱۴+۷ این ساختارها تنها در کاردیومیوسیتهای کاردیوژلی دیده شدند. این یافته‌های جدید قبلاً در کاردیومیوسیتهای مشتق از سلولهای بنیادی جنینی گزارش نشده است.

هشلر (Heschеler) و همکاران [۲۵] و کهات (Kehat) و همکارانش (۲۰۰۱)[۹] گزارش کردند که کاردیومیوسیتهای مشتق از سلولهای بنیادی جنینی موشی و انسانی در قیاس با کاردیومیوسیتهای بزرگسالان فاقد لوله‌های T، نوار H و M هستند. گفته می‌شود سیستم لوله‌های T و نوار M به عنوان نقطه پایانی بلوغ هستند و تنها بعد از تولد ایجاد می‌گردند [۲۷،۲۶] و احتمالاً این ساختارها با فشارهای مکانیکی مرتبط هستند. وجود این ساختارها در این گزارش حتی در گروه بدون ماده زمینه برون‌سلولی ممکن است به عوامل مختلفی مانند شرایط کشت سلولهای ES، نژاد موشی، کیفیت سلولهای ES، تعداد اولیه سلولهای ES در شکل‌گیری جسم شبه جنینی یا کیفیت سرم مورد استفاده در تمایز مرتبط باشد. در مطالعه قبلی، نویسندگان حاضر وجود ساختارهای T و نوار H را در کشت طولانی مدت (۴۰ روزه) کاردیومیوسیتهای مشتق از سلولهای بنیادی جنینی انسان گزارش کرده‌اند[۲۸]. به نظر می‌رسد که کاردیومیوسیتهای رشدیافته بر ماده زمینه برون سلولی مشابه شرایط موجود زنده به‌طور مطلوبی رشد می‌یابند.

ون وینکل (Van Winkle) و همکاران [۱۶] نشان دادند که کاردیومیوسیتهایی که از قلب نوزادان موش جدا می‌شوند، نسبت به لامینین و فیبرونکتین بر کاردیوژل سریعتر می‌چسبند و زودتر ضربانهای خودبه‌خودی خود را شروع می‌کنند وعلاوه بر این از لحاظ ساختاری سازمان یافته‌ترند. مشاهدات مشابهی نیز توسط Bick و همکاران گزارش شد[۲۹]. به‌طوری‌که ایشان با رنگ‌آمیزی هیستوشیمی میوسیتهای نوزادان موش نشان دادند که سلولهایی رشد یافته بر کاردیوژل از نظر میتوکندریایی سریعتر تکوین می‌یابند و جذب کلسیم و فسفریلاسیون آنها افزایش می‌یابد. این یافته‌ها به سود بلوغ سریعتر دستگاه

1. Facia adherence
2. Atrial Natriuretic Factor

انقباضی در کشت بر کاردیوژل است [۳۰]. علاوه بر این نشان داده شده است که سلولهای مشابه بسته به ماهیت ماده زمینه برون سلولی دارای خصوصیات مورفولوژیکی و رشدی متفاوت هستند[۲۱]. به‌طوری‌که مشاهده شده آرایش اجزای ماده زمینه برون سلولی بر فنوتیپ کاردیومیوسیتها اثر می‌گذارد[۶].

احتمالاً همکاری بین مسیرهای پیام‌رسانی که با عواملی چون عوامل تمایزی و رشدی و پروتئین‌های ماده زمینه برون سلولی تحریک می‌شود، تعیین کننده تکثیر و تمایز سلولی است[۳۲].

مهفودی (Mahfoudi) و همکاران گزارش کردند که ماتریژل سبب کسب مورفولوژی تمایزی سلولهای اپی‌تلیال اندومتریوم می‌شود[۳۳]. همچنین کشت سلولهای بنیادی بزرگسالان مغز استخوان بر ماتریژل همراه با فاکتور رشد فیبروبلاستی ۴(FGF-4) و فاکتور رشد هپاتوسیتی (HGF)، سبب کسب خصوصیات مورفولوژیک، عملکردی و فنوتیپی هپاتوسیتها می‌شود [۳۴]. به‌طور مشابه سلولهای بنیادی جنینی میمون با کشت در حضور ماتریژل ساختارهای شبه غده‌ای نابالغ می‌سازند [۳۵].

از طرفی نشان داده شده است که فقدان اینتگرین‌ها (دسته‌ای از گیرنده‌های پروتئین‌های ماده زمینه برون‌سلولی) عمیقاً بر تکوین قلب مؤثر است و نبود اینتگرین β_1، سبب مرگ جنین در روز ۵/۵ می‌شود [۳۸-۳۶]. همچنین حذف اینتگرین β_1 در سلولهای بنیادی جنینی نشان داد که این گیرنده‌ها در قلب‌زایی طبیعی مهم هستند [۳۹،۳۸] نبود اینتگرین β_1 سبب تأخیر در تمایز قلب می‌شود و این موضوع با تأخیر در تجلی ژنهای خاص قلبی و پتانسیل عمل نشان داده شد. در مطالعه حاضر نیز دیده شد که بر هم کنش کاردیوژل که حاوی القاء کننده‌های اینتگرین‌ها است و اینتگرین‌های کاردیومیوسیتها سبب بلوغ سریعتر کاردیومیوسیتها می‌شود.

مفهوم کنام (niche)، دیدگاه جدیدی را در مورد ریز محیط (Microenvironment) در تعیین الگوی تمایز ارایه می‌کند[۴۰]. کنام به عواملی چون غلظت پروتئین‌های تنظیم کننده و پروتئین‌های ماده زمینه برون سلولی بستگی دارد. از سوی دیگر؛ سلولهای سازنده کنام که در مورد کاردیوژل فیبروبلاستهای قلبی هستند مسیر تکوین سلولها را به روش پاراکرین و یا اتوکرین تحت‌تأثیر قرار می‌دهند.

در مجموع، کاردیومیوسیتهای مشتق از سلولهای بنیادی جنینی کشت یافته بر ماده زمینه برون سلولی طبیعی سبب تکوین کاردیومیوسیت‌ها می‌شود. همچنین به نظر می‌آید که خود ماده زمینه‌ای و بعضی از ترکیبات آن به‌طور اختصاصی در رشد و نمو سلولی مؤثرند.

تقدیر و تشکر

بدینوسیله نویسندگان مقاله مراتب سپاس و قدردانی خود را از همکاری صمیمانه آقای دکتر وثوق، آقای شاهوردی و خانم طائی، خانم ملامحمدی، آقای پیریایی و خانم روحانی که ما را در انجام این پروژه یاری نمودند مبذول می‌دارند. این مطالعه با حمایت پژوهشکده رویان انجام شد.

References

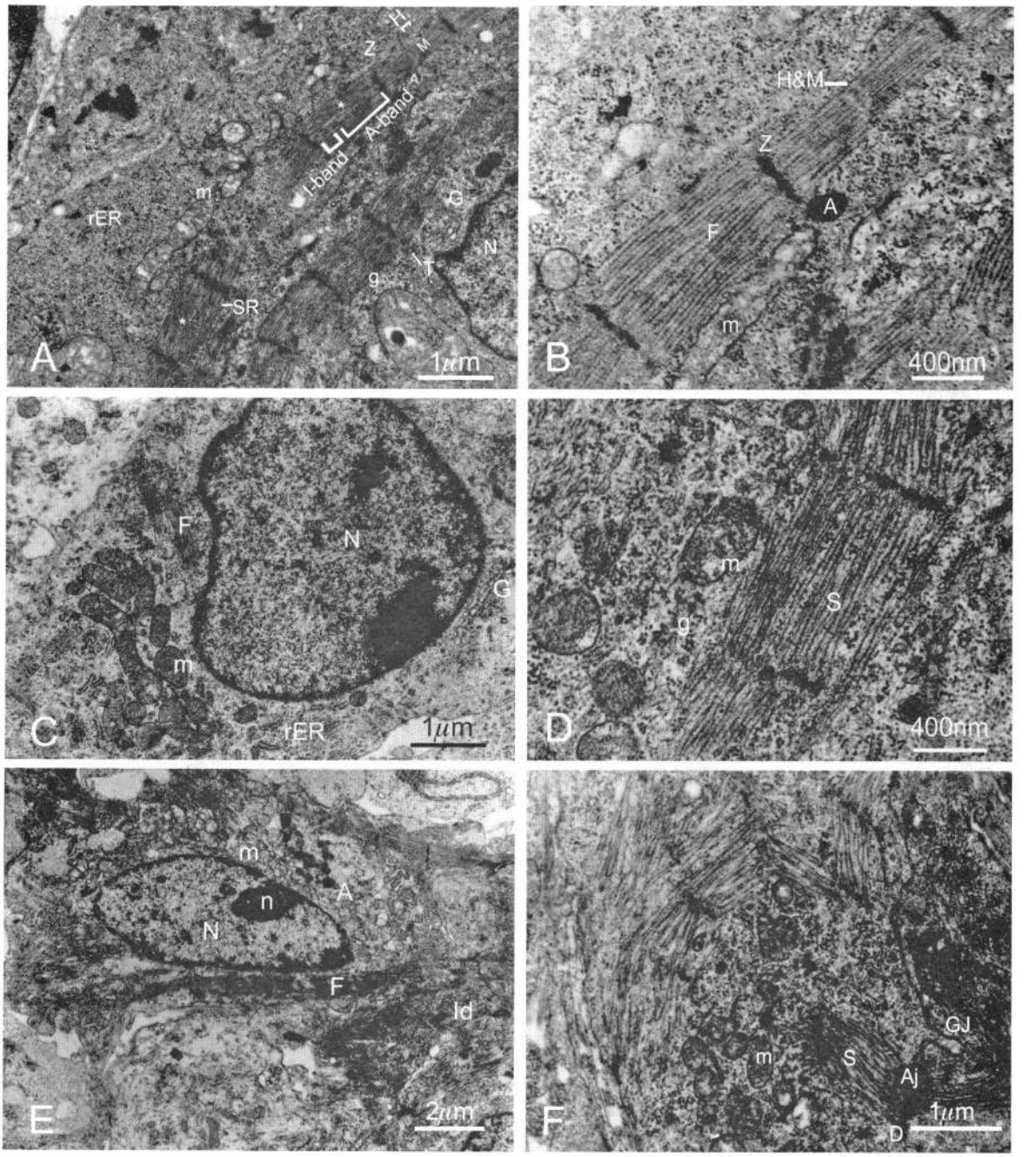
1. **Evans MJ, Kaufman MH.** Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. Nature 1981; 292: 154-56.
2. **Martin G.** Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. Proc Natl Acad Sci USA 1981; 78: 7634-8.
3. **Smith AG.** Embryo-derived stem cells: of mice and men. Annu Rev Cell Dev Biol 2001; 17: 433-62.
4. **Czyz J, Wobus AM.** Embryonic stem cell differentiation: the role extracellular factors. Differentiation 2001; 68: 167-74.
5. **Venstrom KA, Reichard LF.** Extracellular matrix. 2: Role of extracellular matrix molecules and their receptors in the nervous system. FASEB J 1993; 7: 996-1003.
6. **Simpson DG, Terracio L, Terracio M, Price RL, Turner DG, Borg TK.** Modulation of cardiamyocytes phenotype in vitro by the composition and orientation of the extracellular matrix. J Cell Physiol 1994; 161: 89-105.
7. **Thyberg J, Hultgardh-Nilsson A.** Fibronection and the

basement membrane components laminin and collagen type IV influence the phenotypic properties of subcultured rat aortic smooth muscle cells differently. Cell Tissue Res 1994; 276: 263-71.

8. **Maltsev VA, Wobus AM, Rohwedel J, Bader M, Hescheler J.** Cardiamyocytes differentiated in vitro from embrynico stem cell developmentally express cardiac-specific genes and ionic currents. Cire Res 1994; 75: 233-44.
9. **Kehat I, Kenysenti D, Snir M, Segev H, Amit M, Gepstein A, et al.** Human embrynico stem cells can differentiate into myocytes with structural and functional properties of cardiamyocytes. J Clin Inv 2001; 108: 407-14.
10. **Wobus AM, Guan K, Yang HT, Boheler KR.** Embrynico stem cells as a model to study cardiac, skeletal muscle, and vascular smooth muscle cell differentiation. Methods Mol Biol 2002; 185: 127-56.
11. **Xu C, Police S, Rao N, Carpenter MK.** Characterization and enrichment of cardiamyocytes derived from human embrynico stem cells. Circ Res 2002; 91: 501-8.
12. **Hilenski LL, Terracio L, Borg TK.** Myofibrillar and cytoskeletal assembly in neonatal rat cardiamyocytes cultured on iaminin and collagen. Cell Tissue Res 1991; 264: 577-87.
13. **Van Winkle WB, Snuggs M, Miller JC, Buja LM.** Cytoskeletal alterations in cultured cardiamyocytes following exposure to the lipid peroxidation product, 4-hydroxynonenal. Cell Motil Cytoskeleton 1994; 28: 119-34.
14. **Terracio L, Borg TK.** Immunohistochemical characterization of isolated cultured cardiamyocytes. In: Clark WA, Decker RS, Brog TK, (eds). Biology of isolated adult cardiamyocytes. Elsevier, Science Publishing, Inc, NY; 1988, pp 54-67.
15. **Eghbali M, Blumenfeld OO, Seifter S, Buttrick PM, Leinwand LA, Robinson TF, Zern MA, Giambrone MA.** Locatin of types I,III and IV collagen mRNAs in rat heart cells by in situ hybridizatin. J Mol Cell Cardiol 1989; 21: 103-13.
16. **Van Winkle WB, Snuggs MB, Buja LM.** Cardiogel: a biosynthetic extracellular matix for cardiomyocyte culture. In Vitro Cell Dev Biol Anim 1996; 32: 478-85.
17. **Kleinman HK, Luckenbill-Edds L, Cannon FW, Sephel GC.** Use of extracellular matrix components for cell culture. Anal Biochem 1987; 166:1-13.
18. **Baharvand H, Matthaei KI.** Culture conditin 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: 67-81.
19. بهاروند ح، آذرنیا م، پریور ک، کاظمی آشتیانی س. خصوصیات ضرباهنگی (کرونوتروپی) سلولهای عضله قلبی مشتق از بن‌یاخته‌های جنینی. مجله علمی پزشکی کوثر، در دست چاپ، ۱۳۸۳.
20. **Baharvand H, Matthaei KI.** The ultrastructure of mouse embrynic stem cells. RBM Online 2003; 7, 330-35.
21. **Smith SC, Reuhl KR, Craig J, Mc Burney MW.** The role of aggregation in embryonal carcinoma cell differentiation. J Cell Physiol 1987; 131: 74-84.
22. **Wobus AM, Wallukat G, Hescheler J.** Pluripotent mouse embryonic stem cells are able to differntiate into cardiomyocytes expressing chronotropic responses to adrenergic and cholinergic agents and Ca^{2+} channel blockers. Diferentiation 1991; 48: 173-82.
23. **Manasek FJ.** Histogenesis of the embrynic myocardium. AM J Cardiol 1970; 25: 149-68.
24. **Chacko KJ.** Observations on the ultrastructure of rat embryos. J Morphol 1976; 150: 681-709.
25. **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: 149-62.
26. **Viragh S, Challice CE.** Variations in filamentous and fibrillar organization, and associated sarcolemmal structures in cells of the normal mammalian heart. J Ultrastruct Res 1969; 28: 321-34.
27. **Forsgren S, Carlsson E, Strehler E, Thornell LE.** Ultrastructural identification of human fetal purkinje fibres-a comparative immunocytochemical and electron microscopic study of composition and strucuture of myofibrillar M-regions. J Mol Cell Cardiol 1982; 14: 437-49.
28. **Baharvand H, Ashtiani SK, Valojerdi MR, Shahverdi A, Taee A, Sabour D.** Establishment and in vitro differentiation of a new embryonic stem cell line from human blastocyst. Differentiation 2004; 72: 224-29.
29. **Bick RJ, Snuggs MB, Poindexter BJ, Buja LM, Van Winkle WB.** Physical, contractile and calcium handling properties of neonatal cardiac myocytes cultured on

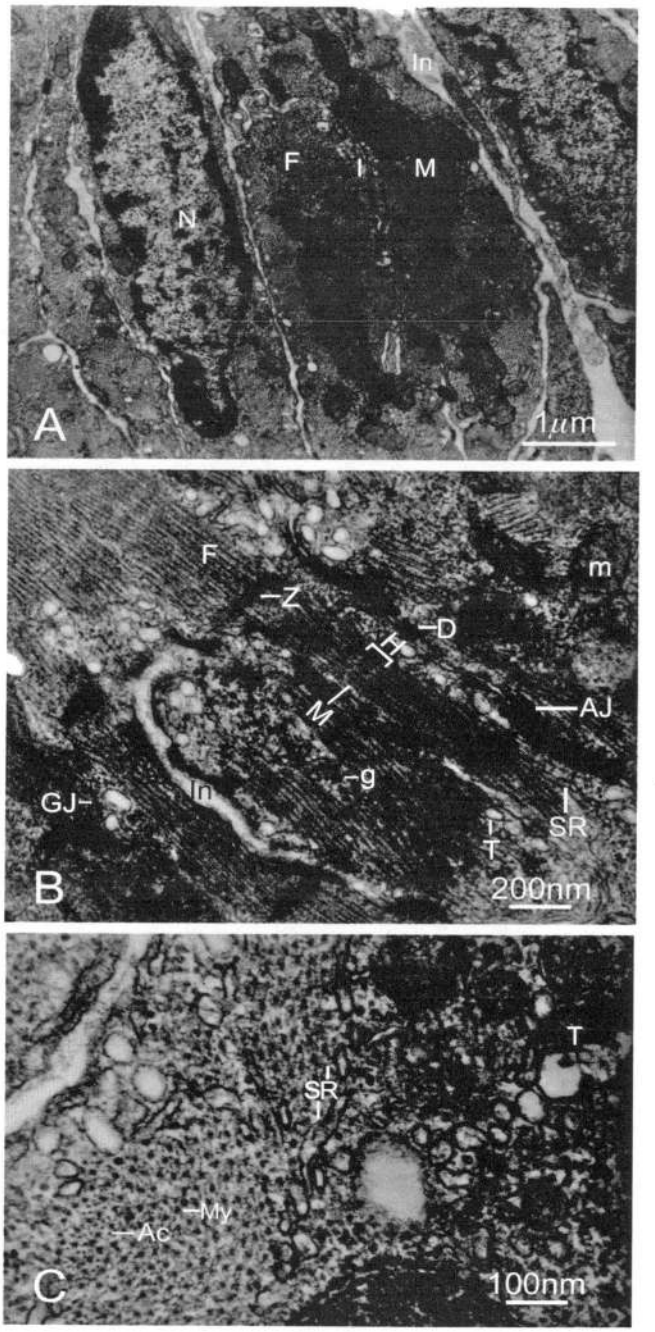
different matrices. Cell Adhes Commun 1998; 6: 301-10.

30. **Merle PL, Feige JJ.** Verdetti J. Basic fibroblast grwoth factor activates calcium channels in neonatal rat cardiomyocytes. J Biol Chem 1995; 270: 17361-67.
31. **Watt F.** The extracellular matrix and cell shape. Trends Biochem Sci 1986; 11: 482-85.
32. **Boudeau NJ, Jones PL.** Extracellular matrix and integrin signalling: the shape of things to come. Biochem J 1999; 339: 481-88.
33. **Mahfoudi A, Fauconnet S, Bride J, Beck L, Remy-Martin JP, Nicollier M, et al.** Serum-free culture of stromal and functionally polarized epithelial cells of guineapig endometrium: a potential model for the study of epithelial-stromal paracrine inteactions. Biol Cell 1992; 74: 255-65.
34. **Schwartz RE, Reyes M, Koodie L, Jiang Y, Blackstad M, Lund T, et al.** Multipotent adult progenitro cells from bone marrow differentiate into functional hepatocyte-like cells. J Clin Invest 2002; 109, 1291-1392.
35. **Kleinman HK, Philp D, Hoffman MP.** Role of the extracellular matricx in morphogenesis. Curr Opin Biotechnol 2003; 14: 526-32.
36. **Fassler R, Meyer M.** Consequence of lack of beta 1 integrin gene expression in mice. Genes Dev 1995; 9: 1896-1908.
37. **Fassler R, Georges - Labouesse E.** Hirsch E. Genetic analyses of integrin function in mice. Curr Opin Cell Biol 1996; 8: 641-46.
38. **Fassler R, Rowwedel J, Maltsev V, Block W, Lentini S, Kaomei G, Gullberg D, Hescheler J, Addicks K, Wobus AM.** Differentiation and integrity of cardiac muscle cells are imparied in absence of integrin. J Cell Sci 1996; 222:111-6.
39. **Guan K, Czyz J, Furst DO, Wobus AM.** Expression and cellular distribution of av integrins in β1 integrin - deficient embryonic stem cell- derived cardiac cells. J Mol Cell Cardiol 2001; 33: 521-32.
40. **Watt FM, and Hogan BL.** Out of Eden: stem cells and their niches. Science 2000; 287: 1427-30.



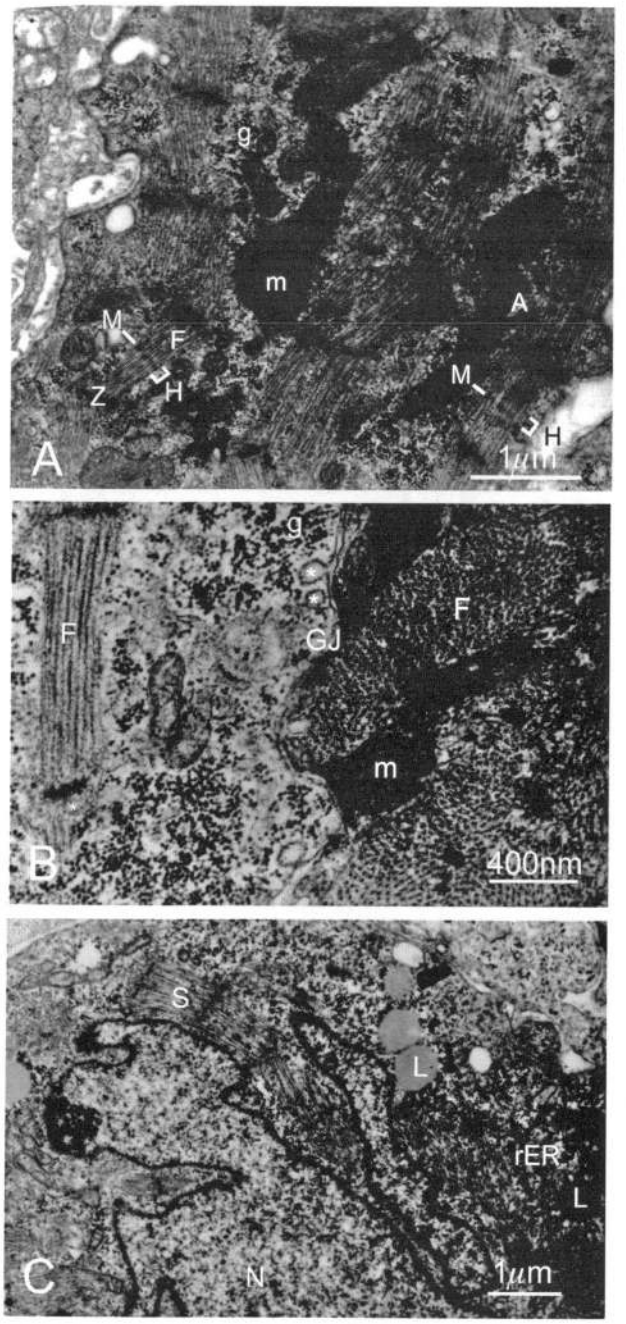
شکل ۱. فراساختار کاردیومیوسیتهای ۱۴ روزه مشتق از سلولهای بنیادی جنینی رشد یافته بر کاردیوژل (B,A)، ماتریژل (D,C) و کنترل (بدون ECM) (F,E): نوارهای H,M

A: ANF، Aj: اتصال چسبنده، D: دسموزوم، F: دسته میوفیبریلی، g: گلیکوژن، G: دستگاه گلژی، GJ: اتصال باز، H: نوار H، Id: صفحه اینترکاله، M: میتوکندری، M: نوار M، N: هسته، n: هستک، rER: شبکه اندوپلاسمی خشن، S: سارکومر، SR: سارکوپلاسمیک رتیکولوم، T: لوله T، Z: نوار Z



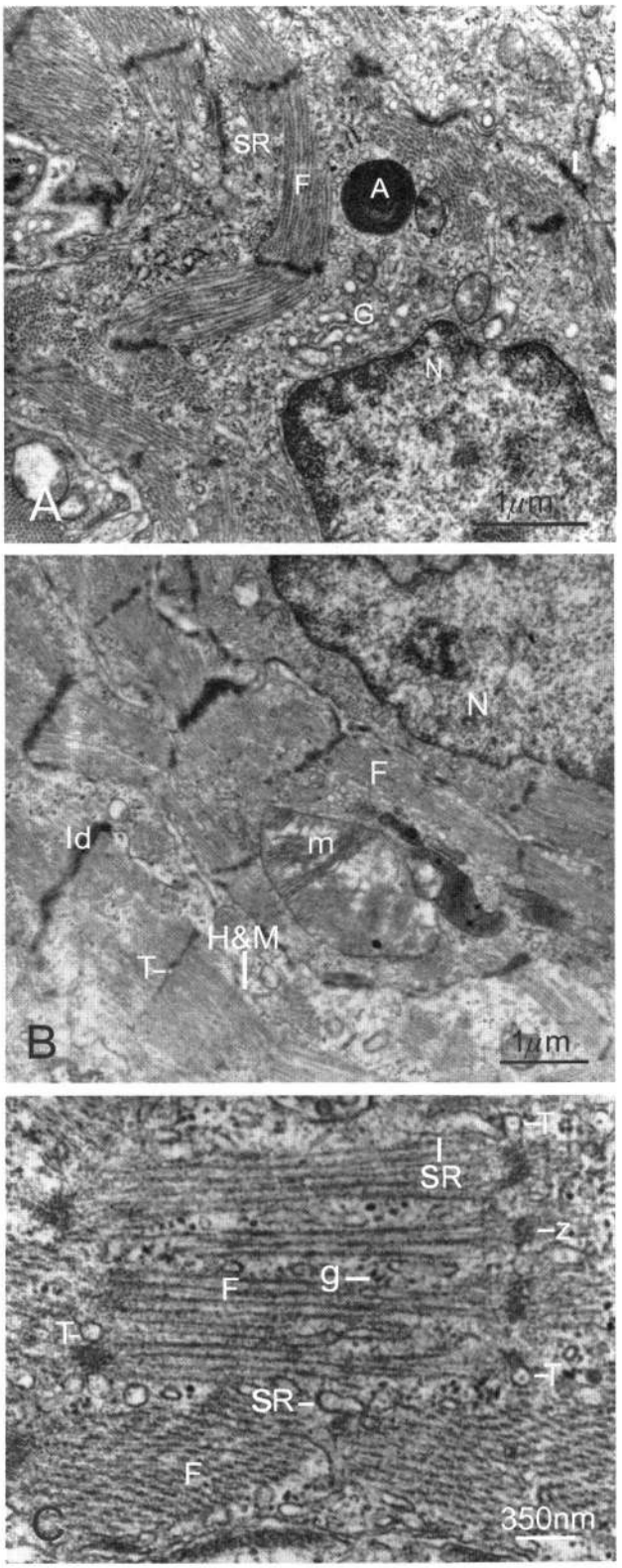
شکل ۲. فراساختار کاردیومیوسیتهای ۲۱ روزه مشتق از سلولهای بنیادی جنینی رشد یافته بر کاردیوژل

AC: اکتین، Aj: اتصال چسبنده، D: دسموزوم، F: دسته میوفیبریلی، g: گلیکوژن، GJ: اتصال باز، H: نوار H، In: فضای بین سلولی، M: میتوکندری، M: نوار M، My: میوزین، N: هسته، SR: سارکوپلاسمیک رتیکولوم، T: لوله T، Z: نوار Z



شکل ۳. فراساختار کاردیومیوسیتهای ۲۱ روزه مشتق از سلولهای بنیادی جنینی رشد یافته بر ماتریژل: چاله‌های پوشش‌دار زیر غشای پلاسمایی

A: ANF، F: دسته میوفیبریلی، g: گلیکوژن، GJ: اتصال باز، H: نوار H، L: لیپید، M: میتوکندری، M: نوار M، N: هسته، rER: شبکه اندوپلاسمی خشن، S: سارکومر، Z: نوار Z



شکل ۴. فراساختار کاردیومیوسیتهای ۲۱ روزه مشتق از سلولهای بنیادی جنینی رشد یافته در گروه کنترل (بدون ECM)

A: ANF، F: دسته میوفیبریلی، g: گلیکوژن، G: دستگاه گلژی، H: نوار H، Id: صفحه اینترکاله، M: میتوکندری، M: نوار M، N: هسته، SR: سارکوپلاسمیک رتیکولوم، T: لوله T، Z: نوار Z