مقاله تحقیقی

بررسی خصوصیات کرونوتروپی کاردیومیوسیتهای مشتق از سلولهای بنیادی جنینی موش پس از تیمار با فاکتور رشد فیبروبلاستی

شیوا خضری .B.Sc*، مجتبی رضازاده ولوجردی .Ph.D**، حوری سپهری .Ph.D***، حسین بهاروند .M.Sc****

* دانشجوی کارشناسی ارشد گروه زیست‌شناسی دانشکده علوم دانشگاه تهران و گروه سلولهای بنیادی پژوهشکده رویان

** استاد گروه علوم تشریح دانشکده پزشکی دانشگاه تربیت مدرس

*** استاد گروه زیست‌شناسی دانشکده علوم دانشگاه تهران

**** استادیار پژوهشی گروه سلولهای بنیادی پژوهشکده رویان

تاریخ وصول: فروردین ماه ۸۳، تاریخ پذیرش: اردیبهشت ماه ۸۳

چکیده

هدف: تأثیر فاکتور رشد فیبروبلاستی بر تمایز کاردیومیوسیتهای حاصل از سلولهای بنیادی جنینی (ES: Embryonic Stem Cells) موش و خصوصیات فارماکولوژیکی آنها

مواد و روشها: تعداد ۸۰۰ سلول بنیادی جنینی موش (Royan B1) در قطرات آویزان و در پتری دیش کشت شدند. پس از دو روز سلولهای ES در هر قطره جمع شده و تشکیل اجسام شبه جنینی (EB: Embryoid Body) 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 bFGF ۱۰ng/ml (basic Fibroblast Growth Factor)تیمار شدند. سپس EBها به صورت منفرد در ظروف کشت سلولی ۲۴ خانه که قبلاً با ژلاتین ۰/۱ درصد مفروش شده بودند کشت شدند. تعداد ضربان EBها در دو گروه کنترل و bFGF به‌صورت روزانه شمارش و تأثیر داروهای کرونوتروپی ایزوپرنالین، کارباکول و فنیل افرین بر کاردیومیوسیتهای حاصل بررسی شد.

یافته‌ها: به‌کارگیری ایزوپرنالین و فنیل افرین بر کاردیومیوسیتهای حاصل سبب افزایش تعداد ضربان در دقیقه در هر دو گروه گردید. اما تعداد ضربان در گروه bFGF در ابتدای تکوین نسبت به گروه کنترل بیشتر بود. به‌طوری که بکارگیری ایزوپرنالین ($p<0.035$) و فنیل افرین ($p<0.019$) سبب افزایش معنی‌دار ضربان نسبت به گروه bFGF شد. همچنین داروی کارباکول سبب کاهش تعداد ضربان در دقیقه در هر دو گروه شد اما تفاوتی در میزان کاهش ضربان هر دو گروه دیده نشد. نتایج شمارش روزانه نیز نشان داد که EBهای گروه کنترل تعداد ضربان در دقیقه بیشتری نسبت به گروه bFGF دارند و پایداری تعداد ضربان در دقیقه در طول زمان در گروه کنترل بیشتر از گروه bFGF است. تفاوت دو گروه در روز ۵+۷ با $p<0.012$، روز ۷+۷ با $p<0.002$، روز ۹+۷ با $p<0.0001$، روز ۱۷+۷ با $p<0.014$ روز ۱۹+۷ با $p<0.001$ معنی‌دار بود.

نتیجه‌گیری: از نتایج به‌دست آمده می‌توان استنباط کرد که bFGF با اینکه بر تجلی یا عملکرد بعضی گیرنده‌ها در کاردیومیوسیتها می‌تواند مؤثر باشد ولی با شرایط مذکور به تنهایی در قلب‌زایی تأثیری ندارد.

کلید واژه‌ها: سلولهای بنیادی جنینی، کاردیومیوسیت، کرونوتروپی، فاکتور رشد فیبروبلاستی

آدرس مکاتبه: تهران، گروه سلولهای بنیادی پژوهشکده رویان
صندوق‌پستی ۱۹۳۹۵-۴۶۴۴ Email:info@Royaninstitute.org

مقدمه

سلولهای بنیادی جنینی (ES) سلولهایی پرتوان (pluripotent)، با خاصیت نامیرایی (immortality) و خودتکثیری (selfrenewal) هستند. این سلولها توانایی متمایز شدن به انواع رده‌های سلولی مثل کاردیومیوسیت، عضله اسکلتی، صاف، کندروسیت، نورون و غیره را دارند. سلولهای بنیادی جنینی اغلب از توده سلولی داخلی (ICM:Inner Cell Mass) جنین در مرحله بلاستوسیست (حدود ۳/۵ روزگی) به‌دست می‌آیند. [۱و۲].

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.

قلب اولین اندام جنینی مشتق از مزودرم است که بعد از گاستروﻻسیون تکامل می‌یابد. به‌طورکلی اضافه شدن سیگنالهای تحریکی و مهاری منجر به تولید قلب می‌شود. مطالعات انجام شده نشان داده است که تکوین سلولهای پیش قلبی مزودرمی به سلولهای قلبی اولیه به‌وسیله سیگنالهای تحریکی ترشح شده از اندودرم قدامی تنظیم می‌شود[۳]. به علاوه سیگنالهای مختلف از مناطق جانبی جنین برای تشکیل قلب ضروری است[۴]. BMP-2 (Bone Morphogenetic Protein) که از اندودرم ترشح می‌شود نقش مهمی در القای تشکیل قلب در مهره‌داران ایفا می‌کند. BMP-2 در *in vivo* سبب تحریک بیان فاکتورهای نسخه‌برداری NKX2.5 و GATA-4 می‌شود[۵]. TGF-β (Transforming Growth Factor β) نیز در تشکیل مزودرم و تکوین قلب در جنین موش نقش دارد. TGF-β همراه با BMP-2 سبب افزایش تمایز قلبی و افزایش مناطق ضربانی و تحریک تولید میوفیبریلها می‌شود[۶]. از فاکتورهای دیگر در تشکیل قلب IGF-1 (Inslin-like Growth Factor) و EPO (اریتروپوئیتین) است که در تکامل قلبی حایز اهمیت است [۷ و ۸]. آنتاگونیست‌های Wnt مثل Crescent و Dkk1 سبب تحریک کاردیوژنز می‌شود[۹]. از جمله سیگنالهای دیگر سیگنالهای FGF (Fibroblast Growth Factor)، است که فعالیت میتوزی و بقای میوسیتهای جنینی را در مراحل اولیه قلب‌زایی تنظیم می‌کنند. به‌طوری‌که مهار سیگنالهای FGF، از القای سلولهای مزودرمی محتوی پیش‌سازهای قلبی ممانعت می‌کند [۹ و ۱۰]. مطالعه انجام شده روی گور خرماهی[1] نشان داد که FGF8 نقش مستقیمی در تکوین سلولهای پیش‌ساز قلبی دارد به‌طوری‌که این فاکتور برای مراحل اولیه بیان nkx2.5 و gata-4 که از فاکتورهای نسخه‌برداری هستند لازم است. جهش fgf8 از شروع بیان ژن‌های فاکتورهای نسخه‌برداری قلبی جلوگیری می‌کند [۱۱]. از طرف دیگر تأثیر FGF روی قلب زایی جوجه هم مطالعه شده است به‌طوری‌که نتایج نشان می‌دهد سیگنالهای FGF رشد میوسیتهای قلبی را در مرحله توبولار تنظیم می‌کنند و تخریب گیرنده‌های FGF، تکثیر و بقای قلب جنینی جوجه را در این مرحله متوقف می‌کند و القای سلولهای مزودرمی محتوی پیش‌سازهای میوسیتی قلبی را مهار می‌کند [۱۲].

bFGF هم به عنوان عضوی از خانواده FGF در القای مزودرم، تنظیم تمایز و رشد سلولی، چسبندگی، مهاجرت، مرگ سلولی و غیره نقش مهمی ایفا می‌کند. bFGF به‌وسیله گیرنده‌های سطح سلولی خاص از خانوادهٔ تیروزین کینازی بنام $FGFR_1$ عمل می‌کند که حضور این گیرنده برای تکوین قلبی ضروری است[۱۳].

در *in vivo* میوسیتهای قلبی پرندگان و پستانداران، فعالیت میتوزی خود را در دورهٔ نوزادی به پایان می‌برند و تولید دوبارهٔ ماهیچه قلبی در دورهٔ بلوغ بعد از آسیب میوکاردیال روی نمی‌دهد[۱۲]. بنابراین شناسایی فاکتورهای رشد محلول یا فاکتورهای رشد متصل به ماتریکس برون سلولی، فاکتورهای رونویسی و آبشارهای پیام‌رسانی برای تمایز سلولهای بنیادی جنینی به سلولهای قلبی به علاوه برای بهبود درمان بیماریهای قلبی براساس سلولهای ES بسیار مهم است. [۹]. بنابراین در

1- Zebrafish

این مطالعه از سلولهای ES به عنوان مدلی برای بررسی اثر bFGF بر کاردیومیوسیتهای متمایز شده از آنها استفاده شد و تأثیر bFGF روی تمایز کاردیومیوسیتهای حاصل از سلولهای بنیادی جنینی موش و خصوصیات فارماکولوژیکی آنها بررسی شد.

مواد و روشها

کشت سلولهای بنیادی جنینی

سلولهای بنیادی جنینی موش (Royan B1) از نژاد C57BL/6 روی لایه تغذیه کننده MEF (فیبروبلاست جنینی موشی) همراه با LIF (فاکتور مهارکننده لوکمیایی) کشت داده شد[۱۴]. محیط کشت برای سلولهای بنیادی عبارت بود از Knockout DMEM (Gibco 10829-018)، 15% FCS (Gibco, 10439-024)، ۱۰۰μM بتا مرکاپتواتانول (Sigma M-7522)، ۲mM L- گلوتامین (Sigma, G-5763)، ۰/۱mM اسیدهای آمینه غیرضروری (Gibco, 11140-035) و فاکتور ممانعت کننده لوکمیایی (LIF) (chemicon ESG 1107) با غلظت ۱۰۰۰iu/ml.

تمایز سلولهای بنیادی جنینی (ES)

سلولهای بنیادی تمایز نیافته از روی لایهٔ تغذیه کننده جداشدند و تعداد ۸۰۰ سلول بنیادی جنینی در قطرات آویزان و در پتری دیش کشت شدند. در داخل پتری دیش ۱۵ml آب بدون یون ریخته شد. پس از دو روز سلولهای ES در هر قطره جمع شده و تشکیل اجسام شبه جنینی (EB) را دادند. به‌دنبال 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$\frac{ng}{ml}$ bFGF (invitrogen 13256-029) تیمار شدند. سپس EBها به صورت منفرد در ظروف کشت سلولی ۲۴ خانه که قبلاً با ژلاتین ۰/۱ درصد (Sigma G-2500) مفروش شده بود نگهداری شدند.

محیط تمایزی استفاده شده در این مرحله یکی از دو محیط زیر بود:

۱ـ DMEM(Dulbeco's Modified Eagle Medium) (Gibco, 12800-058) حاوی ۱۵ درصد FCS (Gibco 10270-106)

۲- Knockout DMEM (Gibco, 10829-018) حاوی ۱۵ درصد FCS خاص ES (Gibco 10439-024)

EBها بعد از چند ساعت به کف ظروف کشت چسبیدند و کاردیومیوسیتهای دارای ضربان با تمایز خودبه‌خود ظاهر و با میکروسکوپ اینورت فازکنتراست Nikon مشاهده شدند.

همچنین تعداد ضربان در دقیقه به صورت روزانه در گروه کنترل در دو محیط DMEM با سرم معمولی و محیط knockout DMEM با سرم مخصوص ES با میکروسکوپ اینورت شمارش شدند.

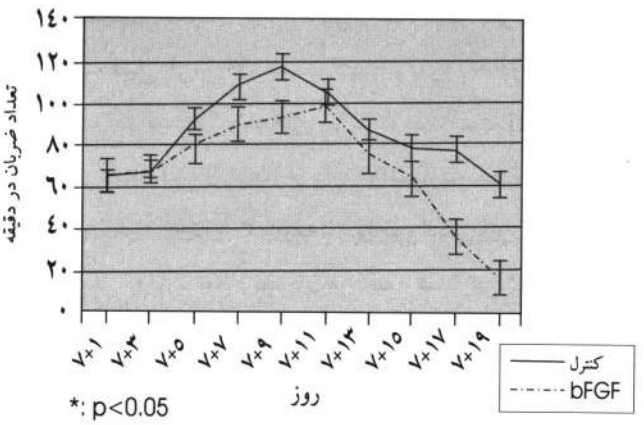
تعداد ضربان در دقیقه به صورت روزانه در دو گروه تیمار شده با bFGF و کنترل با میکروسکوپ اینورت شمارش شدند. به علاوه EBها طی روزهای ۳+۷، ۷+۷ و ۱۴+۷ با داروهای ایزوپرنالین (Sigma, I-5879) و فنیل افرین (Sigma, p-6126) و کارباکول (Sigma, G4382) با غلظت 10^{-5}M تیمار شدند. ایزوپرنالین آگونیست گیرنده‌های β_1 آدرنرژیک، فنیل افرین آگونیست گیرنده‌های α_1 آدرنرژیک و کارباکول، آگونیست گیرنده‌های موسکارینی است [۱۵]. تعداد ضربان در دقیقه قبل از تیمار با داروها شمارش شده و بعد از اضافه کردن دارو حدود ۳ دقیقه در داخل انکوباتور قرار داده شدند. سپس دوباره تعداد ضربان در دقیقه شمارش شد. تفاضل این دو شمارش نشان دهندهٔ تأثیر دارو روی کاردیومیوسیتها بوده است.

داده‌ها با برنامه SPSS و با روش آماری t-Test و به صورت (خطای استاندارد) SEM±میانگین آنالیز شدند. اختلاف میانگین‌ها در گروه کنترل و bFGF مقایسه شد.

یافته‌ها

سلولهای بنیادی جنینی بنا به ماهیتشان و پس از ساخت اجسام شبه جنینی به طور خودبه‌خود به کاردیومیوسیتهای ضرباندار تمایز می‌یابند. نتیجه شمارش نشان داد که تفاوت زیادی بین میزان ضربان در دو محیط DMEM با سرم معمولی و knockout DMEM با سرم مخصوص ES، وجوددارد و

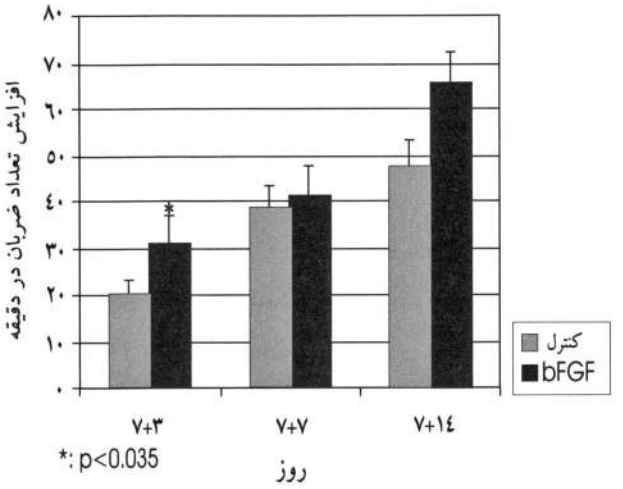
محیط knockout DMEM که دارای سرم مخصوص ES است می‌تواند محیط مناسبی برای سلولهای بنیادی جنینی باشد. از طرف دیگر اوج ضربان در دقیقه در محیط DMEM، ۶۱ و در محیط knockout DMEM، ۱۱۷ بود. در ضمن افت ضربان در طول زمان در محیط DMEM سریعتر از knockout DMEM بود و پایداری ضربان EBها هم کم بود. بنابراین با توجه به نتایج به دست آمده در تحقیق حاضر مطالعه با محیط knockout DMEM با سرم مخصوص ES ادامه یافت و از محیط DMEM با سرم معمولی صرفنظر شد. نتایج شمارش روزانه نشان داد که کاردیومیوسیتهای گروه کنترل تعداد ضربان معنی‌دار بیشتری نسبت به گروه bFGF دارند به‌طوری که اوج ضربان در گروه کنترل روز ۹+۷ با تعداد ۱۱۷ ضربان در دقیقه و در گروه bFGF، روز ۱۱+۷ با ۹۹ ضربان در دقیقه بود. تفاوت دو گروه در روز ۵+۷ با $p<0.012$، روز ۷+۷ با $p<0.002$، روز ۹+۷ با $p<0.0001$، روز ۱۷+۷ با $p<0.014$ روز ۱۹+۷ با $p<0.001$ معنی‌دار بود (نمودار ۱).



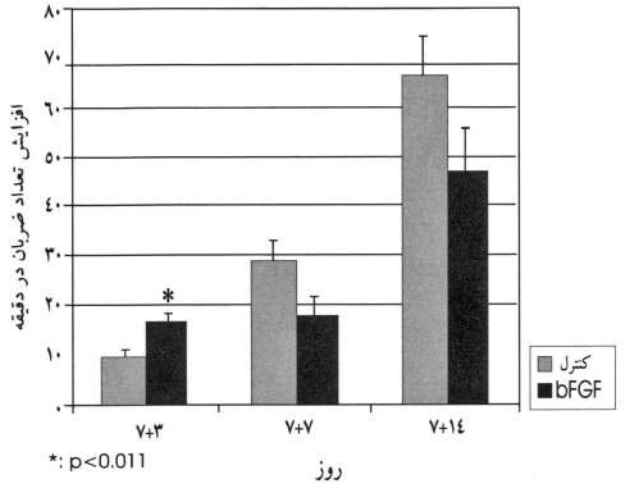
نمودار ۱. مقایسه تعداد ضربان روزانه در دو گروه کنترل و bFGF

بنا به مطالعه هسچلر (Hescheler) و همکاران [۱۵]، تغییرات تکوینی کاردیومیوسیتها با توجه به طول زمان کشت به سه مرحله تمایزی تقسیم می‌شود: ابتدایی، میانی، نهایی که به ترتیب شامل روزهای ۱+۷ تا ۴+۷، ۵+۷ تا ۸+۷ و ۹+۷ تا ۱۸+۷ می‌شود. بنابراین روزهای ۳+۷، ۷+۷ و ۱۴+۷ به عنوان روزهای شاخص در سه دوره مذکور انتخاب شده و داروهای مورد نظر به‌کار برده شد. آزمون دارویی نشان داد که به‌کارگیری ایزوپرنالین ($p<0.035$) و فنیل افرین ($p<0.011$) سبب افزایش معنی‌دار تعداد ضربان نسبت به گروه کنترل در روز ۳+۷ شد (نمودار ۲و۳). کاهش ضربان کاردیومیوسیتهای تیمار شده با کارباکول در تمام روزها در گروه bFGF بیشتر از گروه کنترل بود ولی این تفاوتها معنی‌دار نبود (نمودار ۴).

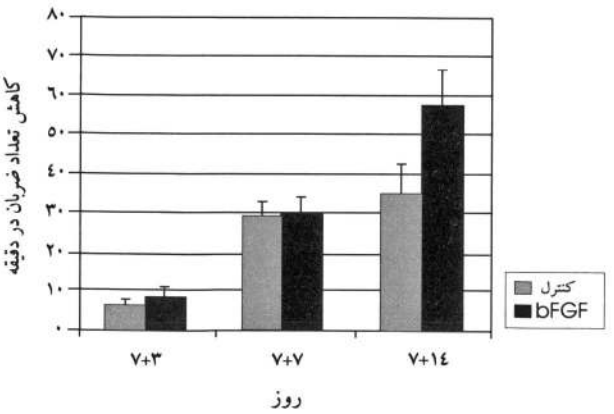
تأثیر تمام داروها بر کاردیومیوسیتهای حاصل در دو گروه کنترل و bFGF نشان داد که پاسخ کرونوتروپی با افزایش روند تکوین کاردیومیوسیتها از مرحله ابتدایی (روز ۳+۷) تا مرحله نهایی (روز ۱۴+۷) افزایش معنی‌داری می‌یابد و به عبارتی پاسخ کاردیومیوسیتها به داروها وابسته به مرحله تکوینی است.



نمودار ۲. مقایسه افزایش ضربان کاردیومیوسیتهای تیمار شده با ایزوپرنالین در دو گروه کنترل و bFGF.



نمودار ۳. مقایسه افزایش ضربان کاردیومیوسیتهای تیمار شده با فنیل افرین در دو گروه کنترل و bFGF



نمودار ۴. مقایسه افزایش ضربان کاردیومیوسیتهای تیمار شده با کارباکول در دو گروه کنترل و bFGF

بحث

در این مطالعه سلولهای بنیادی جنینی به طور خودبه‌خودی به کاردیومیوسیتهای ضرباندار متمایز شدند. نتیجه آنالیزهای انجام شده نشان داد که پاسخ کاردیومیوسیتهای گروه bFGF به داروها بیشتر از گروه کنترل است ولی تعداد ضربان در دقیقه در گروه کنترل بیشتر از bFGF است. افزایش ضربان کاردیومیوسیتهای تیمار شده با فنیل افرین و ایزوپرنالین و کاهش ضربان این سلولها در پاسخ به کارباکول درهر دو گروه با پیشرفت تکوین بیشتر شد.

در مزودرم خلفی همراهی BMP-2 و FGF4 می‌توانند تشکیل قلب را تحریک کند در حالی که هیچ کدام از این فاکتورها به تنهایی نمی‌توانند چنین کاری انجام دهند. بنابراین سیگنالهای FGF و BMP برای مشتق شدن سلولهای مزودرمی قلبی تمایز یافته با هم همکاری می‌کنند [۱۶]. در مطالعه ما هم شاید علت بی‌تأثیر بودن bFGF بر تمایز کاردیومیوسیتها در محیط آزمایشگاهی این باشد که به تنهایی نقشی در تمایز ندارد و باید همراه فاکتورهای دیگر استفاده شود. فعالیت بیولوژیکی bFGF در میوکاردیوم بالغ هم بررسی شده است به طوری که نتیجه مطالعات نشان می‌دهد که فاکتور bFGF تنظیم کننده اعمال سلولی مثل تکثیر، تمایز، بقا، چسبندگی، مهاجرت و فرایندهایی مثل تشکیل اعضا، بهبود زخمها، تومورزایی، رگزایی، تجدید مدل[1] عروق خونی است. در میوکاردیوم بالغ bFGF به‌وسیلهٔ انواع سلولها مثل کاردیومیوسیت‌ها، فیبروبلاستها و سلولهای ماهیچه صاف بیان می‌شود [۱۳].

علاوه بر این گزارشها، تمایز سلولهای P19 به سلولهای قلبی و اسکلتی در حضور FGF و غلظت مناسب اسیدرتینوئیک هم مطالعه شده است. مشاهده شده که aFGF خارجی (acidic fibroblast gorwth factor)، ژن αMHC (myosin heavy chain) قلبی را با القای BMP4 و GATA4 فعال می‌کند و باعث تمایز قلبی می‌شود اما برخلاف aFGF، bFGF خارجی بیان noggin (آنتاگونیست BMP4) را افزایش داده و بیان GATA4 را مهار می‌کند و در کل باعث تمایز ماهیچه اسکلتی می‌شود [۱۷].

گزارش شده که سلولهای بنیادی تمایز نیافته قادر به تولید پتانسیل عمل نیستند. ولی در کاردیومیوسیتهای متمایز شده از ES شکلهای مختلف پتانسیل عمل با بیان انواع کانالهای یونی هماهنگ است [۱۸]. در کاردیومیوسیتهای مراحل اولیه تمایز، کانالهای Ca^{2+} نوع L وابسته به ولتاژ و کانالهای K^+ تولید می‌شوند. کاردیومیوسیتهای مراحل میانی، کانالهای Na^+، Ca^{2+} و K^+ را بیان می‌کنند. در مرحله نهایی تمایز کانالهای Ca^{2+} سه برابر مرحله اولیه تمایز بیان می‌شوند. به علاوه انواع کانالهای K^+ و کانالهای Na^+ هم در این مرحله بیشتر می‌شوند [۱۵].

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 به‌طوری‌که مهارکننده‌های کانالهای کلسیمی آثار کرونوتروپیک منفی روی کاردیومیوسیتها ایجاد می‌کنند [۱۹].

کانالهای Na^+ در مراحل اولیه تمایز (۲+۷ تا ۳+۷) دیده نمی‌شوند اما در مدت تکوین ظاهر می‌شوند. تقریباً همه کاردیومیوسیتها در مراحل انتهایی تمایز، کانال Na^+ را بیان می‌کنند. کانالهای K^+ هم در سراسر دورهٔ تمایز در سلولهای ضرباندار بیان می‌شوند و تراکم این کانالها در مراحل نهایی تمایز در مقایسه با مراحل اولیه افزایش می‌یابد. دیده شده که کانالهای K^+ نقش مهمی در تعیین مدت پتانسیل عمل در

1- Remodeling

کاردیومیوسیتها ایفا می‌کنند [۱۵].

مطالعات انجام شده در *in vivo* روی کاردیومیوسیتهای موشی نشان می‌دهد که این سلولها انواع گیرنده‌ها از جمله β_1-آدرنوسپتورها، β_2 - آدرنوسپتورها، α_1 - آدرنوسپتورها و گیرنده‌های موسکارینی را بیان می‌کنند [۲۰]. برای اثبات حضور گیرنده‌ها در کاردیومیوسیتهای مشتق از ES، پاسخ گیرنده‌ها نسبت به عوامل کرونوتروپیک مثبت و منفی بررسی شده است به‌طوری‌که به‌کارگیری آگونیست β_1 - آدرنوسپتور (ایزوپرنالین) سبب افزایش معنی‌دار تعداد ضربان می‌شود. کاردیومیوسیتهای متمایز شده علاوه بر β-آدرنوسپتورها، α_1-آدرنوسپتورها را هم بیان می‌کنند. آگونیست α_1 آدرنوسپتورها (فنیل افرین) هم سبب افزایش تعداد ضربان می‌شود. اثرهای کرونوتروپیک منفی روی کاردیومیوسیتها به‌وسیله کارباکول (آگونیست گیرنده‌های موسکارینی) اعمال می‌شود. لازم به توضیح است که تمام گیرنده‌های ذکر شده در مراحل اولیه تمایز بیان می‌شوند [۱۹، ۲۱ و ۲۲].

نتایج تحقیق حاضر هم نشان داد که ایزوپرنالین و فنیل افرین سبب افزایش تعداد ضربان و برعکس کارباکول سبب کاهش تعداد ضربان کاردیومیوسیتها می‌شود. بر این اساس وجود گیرنده‌های آدرنرژیک و کولینرژیک از مرحله ابتدایی در کاردیومیوسیتهای مشتق از ES دیده شد. به طور کلی از مطالعات انجام شده چنین به نظر می‌رسد که bFGF با اینکه در محیط *in vivo* سبب القای 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 α_1 و β_1 - آدرنرژیک یا عملکرد آنها در ابتدای تکوین (۳+۷) بیشتر می‌شود به‌طوری‌که به‌کارگیری ایزوپرنالین و فنیل افرین در این روز سبب افزایش معنی‌دار تعداد ضربان در گروه bFGF نسبت به گروه کنترل می‌شود. بنابراین سلولهای بنیادی جنینی می‌توانند به عنوان مدلی برای مطالعات فیزیولوژیکی، فارماکولوژیکی، تکوینی و غیره کاربرد داشته باشند.

References

1. **Evans MJ, Kaufman MH.** Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. Nature 1981; 292: 154-6.
2. **Martin G.** Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem sells. Proc Natl Acad Sci USA 1981; 78: 7634-8.
3. **Montgomery Mo, Litvin J, Gonzalez-Sanchez A, Bader D.** Stating of commitment and differentiation of avian cardiac myocytes. Dev Biol 1994; 164: 63-71.
4. **Schulthesis TM, Xydas S, Lassar AB.** Induction of avian cardiac myogenesis by anterior endoderm. Development 1995; 121: 4203-14.
5. **Orkin SH.** GATA-binding transcription factors in hematopoietic cells. Blood 1992; 80: 575-81.
6. **Behfar A, Hodgson DM.** Stem cells differentiation requires a paracrine pathway in the heart. FASEB J 2002; 16: 1558-66.
7. **Fishman MC, Chien KR.** Fashioning the vertebrate heart: earliest embryonic decisions. Development 1997; 127: 2099-117.
8. **Wu H, Lee SH, Gao J, Liu X, Iruela-Arispe ML.** Inactivation of erythropoietin leads to defects in cardiac morphogenesis. Development 1999; 126: 3597-605.
9. **Sachindis A, Fleischman B.K, Kolossov E, Wartenberg M, Sauer H, Hescheler J.** Cardiac specific differentiation of mouse embryonic stem cells. Cardiovasc Res 2003; 58: 278-91.
10. **Schuldiner M, Yanuka O, Itskovitz-Eldor J, Melton D, Benvenisty N.** Effects of eight growth factors on the differentiation of cells derived from human embryonic stem cells. PNAS 2000; 97: 11307-12.
11. **Reifers F, Walsh E, Leger S, Stainier D, Brand M.** Induction and differentiation of zebrafish heart requires fibroblast growth factor 8 (fgf8/acerebellar). Development 2000; 127: 225-35.
12. **Mima T, Heno H, Fischana D, Nikawa T, Wiliams L.** Fibroblast growth factor receptor is required for in vivo cardiac myocyte proliferation at early embryonic

stages of heart development. Porc Nath Acid Sci USA 1995; 92: 467-71.

13. **Detillieux K, Sheikh F, Kardami E, Cattini P.** Biological activities of fibroblast growth factor-2 in the adult myocardium. Cardiovasc Res 2003; 57: 8-19.
14. **Baharvand H, Matthaei K.** 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 Animal 2004; 40: 76-81.
15. **Hescheler J, Fleischmann B.K, Lentini S, Maltsev V.A, Rohwedel J, Wobus A.M, Addicks K.** Embryonic stem cells: a model to study strucutral and functional properites in cardiomyogenesis. Cardiovasc Res 1997; 36: 149-62.
16. **Brand T.** Heart development: molecular insights into cardiac specification and early morphogenesis. Developmental Biol 2003; 258: 1-19.
17. **Hidai C, Masako O, Ikede H, Nagashima H, Matsuoka R.** FGF-1 enhanced cardiogenesis in differentiating embryonal carcinoma cell cultures, which was opposite to the effect of FGF-2. J Mol Cell Cardiol 2003; 35: 421-5.
18. **Kleppish T, Wobus AM, Hescheler J.** Voltage-dependent L-type Ca^{2+} channels and a novel type of non-selective cation channel activited by CAMP-dependent phosphorylation in mesoderm-like (MES-1) cells. Cell Signal 1993; 5: 727-34.
19. **Wobus AM, Wallukut G, Hescheler J.** Pluripotent mouse embryonic stem cells are able to differentiate into cardiomyocytes expressing chronotropic responses to adrenergic and cholinergic agents and Ca^{2+} channel blockers. Differentiation 1991; 48: 173-82.
20. **Hakuno D, Fukuda K, Makino Sh, Konishi F, Tomita Y, Manabe T, et al.** Bone marrow- Derived Regenerated Cardiomyocytes (CMG cells) Express functional adrenergic and muscarinic receptors. Circulation 2002; 105: 380-6.
21. **Fozzard HA.** Cardiac sodium and calcium channels: a history of excitatory currents. Cardiovasc Res 2002; 55: 1-8.
22. **Endoh M.** Signal transduction of myocardial α_1-adrenoceptors: regulation of ion channels, intracellular calcium and force of contraction. J Appk Cardiol 1991; 6: 379-99.