

مقایسه ویژگیهای سینتیکی آنزیم کراتین کیناز سلولهای عضله قلبی مشتق از سلولهای بنیادی جنینی و نوزاد موش

رزیتا زنوزی* M.Sc.، سعید کاظمی آشتیانی** Ph.D.
سامان حسینیخانی*** Ph.D.، حسین بهاروند** Ph.D.

چکیده

هدف: مطالعه سلولهای عضله قلبی مشتق از سلولهای بنیادی جنینی در زمینه های مختلف علوم زیستی در حال انجام است. هدف از این تحقیق شناخت وضعیت متابولیسم سلولهای مورد بحث در روزهای انتهایی تکامل (۷+۱۰)، بر پایه مطالعه ثابتهای سینتیکی آنزیم کراتین کیناز (CK) در آنها و مقایسه آن با سلولهای عضله قلبی طبیعی است.

روش بررسی: در این مطالعه سلولهای بنیادی جنینی به سلولهای عضله قلبی تمایز داده شد و سلولهای عضله قلبی طبیعی از نوزاد ۲-۴ روزه موش جداسازی شد. در ادامه به منظور استخراج آنزیم، سلولها با سونیکاتور لیز شده و سوپ رویی بعد از سانتریفوژ جدا شد و ثابتهای سینتیکی آنزیم CK بکمک روش های طیف سنجی فوتومتری محاسبه گردید.

یافته‌ها: به کمک روش های طیف سنجی فوتومتری فعالیت قابل ملاحظه ای برای CK، CK_{MB} مشاهده گردید. K_{mCrP} آنزیم CK در سلولهای عضله قلبی مشتق از سلولهای بنیادی برابر $3/26 \pm 0/26$ mM و در سلولهای قلبی طبیعی $5/67 \pm 0/35$ mM بود. فعالیت ویژه آنزیم در سلولهای عضله قلبی مشتق از سلولهای بنیادی برابر $50/25 \pm 2/21 \mu\text{mol min}^{-1}\text{mg}^{-1}$ و در سلولهای قلبی طبیعی این کمیت برابر با $43/48 \pm 2/04 \mu\text{mol min}^{-1}\text{mg}^{-1}$ بود، بیشترین میزان فعالیت آنزیم حاصل از سلولهای عضله قلبی مشتق از سلولهای بنیادی در pH برابر ۷ و نمونه طبیعی در ۶/۵ بود و دمای بهینه برای هر دو نمونه در 45°C حاصل شد.

نتیجه گیری: نتایج حاصل از این تحقیق برخی تفاوتها را در ثابتهای سینتیکی آنزیم کراتین کیناز موجود در دو گروه نشان داد.

واژه‌های کلیدی: سلولهای بنیادی جنینی موش، سلولهای عضله قلبی موش، سینتیک، کراتین کیناز

مقدمه

تمرکز بسیاری از محققان روی مطالعه تمایز این سلولها به سلولهای قلبی و مقایسه آن با کاردیوژنز در بدن موجود زنده است. (۱) سلولهای بنیادی جنینی سلولهای پرتوانی هستند که اغلب از توده سلولی داخلی (Inner cell mass) بلاستوسیت، قبل از لانه

سلولهای بنیادی جنینی (Embryonic Stem Cells, ESCs) مدل‌های بسیار خوبی برای بررسی و تجزیه و تحلیل مراحل تمایز در شرایط آزمایشگاهی (in vitro) به شمار می‌روند. بنابراین

کننده برای بهره گیری مطلوب تر از فسفوکراتین موجود می باشد. (۹) زیرا ایزوفرم های مختلف آنزیم ثابتهای سینتیکی (از جمله K_m) متفاوتی دارند. (۱۰) بنابراین بررسی آنزیم مورد بحث از دیدگاه سینتیک نتایج ارزشمندی در مورد میزان بیان ژن، غلظت فیزیولوژیک سوبستراهای آنزیم، وضعیت متابولیکی و تکاملی سلول و موقعیت جایگاه فعال آنزیم ارائه می دهد. لذا این مطالعه برای بررسی خصوصیات سینتیکی آنزیم کراتین کیناز سلولهای عضله قلبی مشتق از سلولهای بنیادی و مقایسه آن با سلولهای عضله قلبی حاصل از نوزاد موش انجام شد.

روش بررسی

کشت سلولهای بنیادی جنینی. سلولهای بنیادی جنینی (رویان B1) (۱۱) مشتق از موش نژاد C57BL/6 روی لایه سلولی تغذیه کننده حاصل از سلولهای فیبروبلاستی موش که تقسیم آنها با مایتومایسین C متوقف شده بود در محیط ذیل کشت شدند:

۰/۱ mM Knock out Dulbeccos Modified Eagle

Medum (Ko- DMEM, Gibco: 10029-018)

β - مرکاپتو اتانول (Sigma: M-7522)، ۱۵ درصد سرم

جنین گاوی (FCS, Gibco: 10270-106)، ۰/۱ mM اسیدهای

آمینه غیر ضروری (Gibco: 11140-035)، ۱۰۰۰ U/ml فاکتور

مهار کننده لوکمیایی (LIF: Chemicon, ESGRO, ESG1107)

L۲ mM - گلوتامین (Sigma: G-5763).

تمایز سلولهای بنیادی جنینی به سلولهای عضله قلبی.

سلولهای عضله قلبی به روشی که قبلاً بیان شده است از سلولهای

بنیادی جنینی حاصل شدند. (۴) بطور خلاصه تعداد ۸۰۰ سلول

بنیادی جنینی در هر قطره ۲۰ μ l از محیط کشت بدون LIF

بصورت آویزان (hanging drop) در درب پتری دیش کشت

شدند. به سلولها دو روز فرصت داده شد تا تجمع حاصل کرده و

اجسام شبه جنینی (Embryoid bodies, EBs) تشکیل شود. در

ادامه اجسام شبه جنینی به مدت ۵ روز در سوسپانسیون سلولی

حاوی محیط Ko-DMEM قرار داده شد و در روز هفتم اجسام

شبه جنینی به ظروف کشت شش خانه که با ژلاتین ۰/۱٪

گزینی جنین حاصل شده اند، قدرت نوسازی (Self-renewal) و تکثیر خود به خود و نامحدود و تمایز به سلولهای مختلف از جمله ویژگیهای منحصر بفرد آنهاست. (۲،۳) با توجه به خصوصیات مذکور و بدلیل کارایی بالای آنها در درمان و تحقیقات انجام مطالعات بسیاری در زمینه های علوم سلولی و مولکولی (۱،۴)، فیزیولوژی (۵،۴)، فارماکولوژی و فراساختار (۶) در مورد سلولهای مورد بحث و مشتقاتشان آغاز شده است. بنابراین انجام مطالعات آنزیمی نیز به منظور بررسی وضعیت متابولیکی و تکاملی سلولهای عضله قلبی حاصل از سلولهای بنیادی جنینی که در شرایط متفاوتی نسبت به سلولهای عضله قلبی طبیعی تمایز یافته اند نتایج ارزشمندی را در پی خواهد داشت چرا که عملکرد این کاتالیزورهای زیستی منطبق بر تغییرات محیط داخلی و مرحله تکاملی موجود زنده صورت می گیرد و متناسب با آن تغییر می کند که البته با توجه به مطالعات ما تا کنون گزارشی در این زمینه ارائه نگردیده است.

در مطالعه متابولیسم انرژی در قلب آنزیمهای مختلفی وارد

عمل می شوند که از جمله آنها می توان به آنزیم کراتین کیناز

(ATP: Creatine N-phosphoryl transferase: 2, 7, 3, 2;

CK) اشاره کرد. کراتین کیناز مرکز متابولیسم انرژی در سلول

بوده و فسفوریلاسیون برگشت پذیر کراتین (Cr) را کاتالیز

می کند، کراتین فسفات (CrP) محصول واکنش بعنوان یک مخزن

فسفات پرانرژی قادر به فراهم کردن ATP برای سلولهای مختلف

از جمله قلب است. کراتین کیناز دارای دو زیر واحد سیتوزولی است

که توسط دوژن جداگانه کد می شود، B زیر واحد مغزی و M زیر

واحد عضلانی است که از ترکیب این دو زیر واحد ایزوآنزیمهای

MM (عضلانی)، MB (قلبی) و BB (مغزی) تشکیل می شوند.

(۷) سیستم ایزوآنزیمی CK یکی از مهمترین مدل های است که

اطلاعات گسترده ای در مورد وضعیت تکاملی و متابولیکی و

فیزیولوژیکی بافت ارائه می دهد. برای توجیه این مطلب لازم به

ذکر است که زیر واحد B زیر واحد اصلی در دوران جنینی بوده و

بعد از تولد کاهش می یابد (۸) و مکمل این موضوع افزایش

ایزوفرم MB بعد از حمله قلب (ناشی از کمبود سوبسترا و اکسیژن)

است که بر پایه مطالعات سایر محققین، ناشی از یک تغییر سازگار

ساعت در انکوباتور CO₂ ۵٪ و ۳۷°C انکوبه شد تا بر طبق تمایل سلولهای مختلف به چسبیدن یا معلق ماندن جداسازی سلولهای عضله قلبی انجام شود. در ادامه محلول رویی که حاوی سلولهای قلبی است به مدت ۲۰ دقیقه در ۱۸۰۰ rpm سانتریفوژ شد و رسوب حاصل سه بار با PBS⁻ شسته شد و تا موقع مصرف در ازت مایع نگهداری گردید.

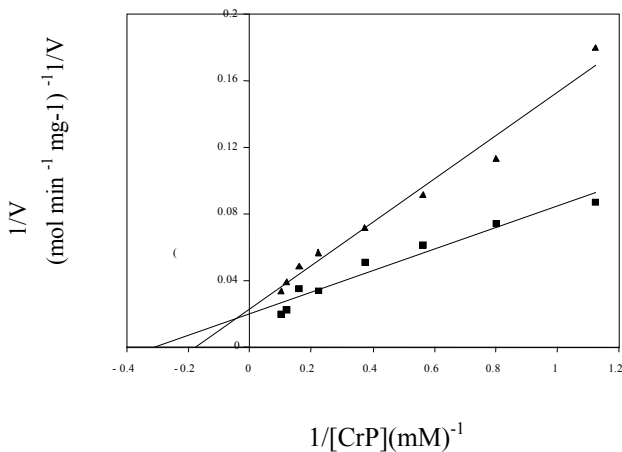
آماده سازی نمونه برای سنجش آنزیمی . سلولهای جداسازی شده از هر دو نمونه در بافر PBS⁻ و pH برابر ۷/۴ شامل ۵ mM β مرکاپتواتانول و ۵mM PMSF (Sigma: ۵mM PMSF) (Phenyl Methane Sulfonyl Fluoride) P7626) روی یخ توسط سونیکاتور لیزگردید و در ادامه هر دو نمونه در ۱۴۰۰۰ rpm و ۴°C به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفوژ شد و محلول رویی برای تعیین غلظت پروتئین و سنجش آنزیمی جدا گردید. سنجش آنزیم کراتین کیناز به کمک طیف سنجی فوتومتر از طریق جفت کردن آنزیم با دهیدروژناز (گلوکز- ۶- فسفات دهیدروژناز) که محصولی با جذب قابل ملاحظه (NADPH) تولید می کند در ۳۴۰nm انجام گرفت. انجام این مراحل در محلولی شامل: ۱۸۶ mM کراتین فسفات (Roche: 10-003-506)، ۲/۴ mM آدنوزین مونو فسفات (AMP) (Roche: 10-000-094)، ۱۲mM دی آدنوزین پنتافسفات (Roche: 10-161-624)، ۲/۴ mM EDTA (Merck: 8421) ۱۱۰ mM بافر ایمیدازول (Sigma: I56749) ۲۱mM گلوکز (Sigma: G6152) ۱۱ mM استات منیزیم (Sigma: M2545) ۲/۴mM نیکوتین آمیدآدنین دی نوکلوتید فسفات (Roche: 10-004-669) (NADP) ۲/۵ U/ml آنزیم هگزوکیناز (Roche: 11-149-130) ۱/۵ U/ml آنزیم گلوکز-۶- فسفات دهیدروژناز (Roche: 11-293-206) ۲۴ mM N- استیل سیستئین (Swissmedic: 011001) و آنتی CK-M انجام گرفت و در ادامه ثابت میکائیلیس منتون (K_m) و فعالیت ویژه آنزیم (Specific activity) با رسم معادله لاینوربرگ برای سوبسترای کراتین فسفات محاسبه گردید و در کلیه مراحل دما در ۳۷°C و pH در ۶/۵ ثابت قرار داده شد. علاوه بر این بر طبق یک روش مهار ایمنی با استفاده از یک آنتی بادی مونوکلونال بر علیه زیر واحد

(Sigma: G-2500) ژلاتینه شده منتقل و در انکوباتور CO₂ ۵٪ انکوبه شد. ده روز بعد یعنی در روز ۷+۱۰ سلولهای عضله قلبی ضرباندار بوسیله پیپت پاستور در زیر میکروسکوپ فاز کنتراست (Nikon) جدا شدند و بعد از شستشو با PBS⁻ (Phosphate Buffer Saline)، تا موقع مصرف در تانک ازت مایع نگهداری شدند.

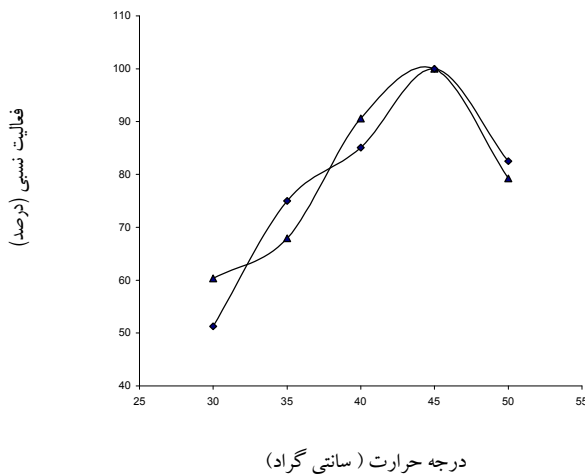
جداسازی سلولهای عضله قلبی از نوزاد موش . سلولهای عضله قلبی با تغییر در روش Chlopcikova و همکاران (۱۲) از قلب نوزاد موش جدا شد. بطور خلاصه ابتدا قلبهای نوزاد ۲-۴ روزه موش جدا شده و در بافر ۴°C شامل مواد ذیل شستشو داده شد:

HEPES ۲۰mM (Sigma: H-7006) ، ۱ mM فسفات دی هیدروژن سدیم (Sigma: P-5011) ، ۵/۴ mM کلرید پتاسیم (Sigma: P-5405) ، ۱۲۰mM کلرید سدیم (Sigma: S-5885) ، ۵/۵ mM گلوکز (Sigma: G- 6152) در pH برابر ۴ ۷/۳-۷/۴. سپس قلبها را از سرسوزن ۱۸G عبور داده و نمونه حاصل را با محلول هیپارین ۰/۱۶ mg/ml در PBS⁻ شستشو داده تا رگها و سلولهای خونی آن زدوده شود، سپس نمونه حاصل به بافر تریپسین ۰/۲٪ اضافه شد و در ۳۷°C به مدت ۲۰ دقیقه تکان داده شد. محلول حاصل را که حاوی سلولهای خونی است بیرون ریخته و به نمونه محلول تازه افزوده شد و مجدداً به مدت ۲۰ دقیقه در حرارت ۳۷°C تکان داده شد و این عمل تا هضم کامل سلولهای مورد نظر ادامه داده شد. محلول نهایی بدست آمده به مدت ۲۰ دقیقه در ۱۸۰۰ rpm سانتریفوژ شده و رسوب حاصل در محیط کشت شامل:

Dulbecco's ۱۳/۵g/l (DMEM, Gibco: 12800-116) Modified Eagle Medium ، ۳/۷g کرینات هیدروژن سدیم (Sigma: S-5761) ، ۱۵ درصد سرم جنین گاو (FCS, Gibco: 1027-106) ، ۱٪ L- گلوتامین (Sigma: G-5763) و ۱٪ اسیدهای آمینه غیر ضروری (Gibco: 11140-035) مخلوط شد و در ادامه با استفاده از شیب پر کل و در ۶۰۰۰ rpm به مدت ۳۰ دقیقه ، سلولها از بین دو لایه جمع آوری شد و پس از شستشو با محیط کشت ذکر شده در فلاسک کوچک ژلاتینه به مدت ۲-۱/۵



نمودار ۱. لینووربرگ آنزیم کراتین کیناز استخراج شده از سلولهای عضله قلبی مشتق از سلولهای بنیادی جنینی (■) و سلولهای قلبی موش (▲).



درجه حرارت (سانتی گراد)

نمودار ۲. پروفایل دمای آنزیم کراتین کیناز استخراج شده از سلولهای عضله قلبی مشتق از سلولهای بنیادی جنینی (■) و سلولهای قلبی موش (▲)

بررسی فعالیت آنزیم CK در محدوده دمایی $30-50^{\circ}\text{C}$ بر طبق شکل ۳ نشان داد که دمای بهینه برای آنزیم CK حاصل از سلولهای عضله قلبی مشتق از سلولهای بنیادی و سلولهای عضله قلبی طبیعی در 45°C می باشد.

CK-M این زیر واحد مهار گردید و فعالیت CK-B اندازه گیری شد و برای تخمین فعالیت CK_{MB} بدلیل فعالیت یکسان این دو زیر واحد، مقدار بدست آمده دو برابر شد و نتایج حاصل از سه گروه آزمایش با نمونه های حاصل از کشت های مختلف سلولهای بنیادی جنینی و سلولهای استخراج شده از قلب موش و سه بار تکرار هر کدام ارائه گردید، علاوه بر این پروفایل pH و دمای بهینه آنزیم نیز برای هر دو نمونه تعیین گردید.

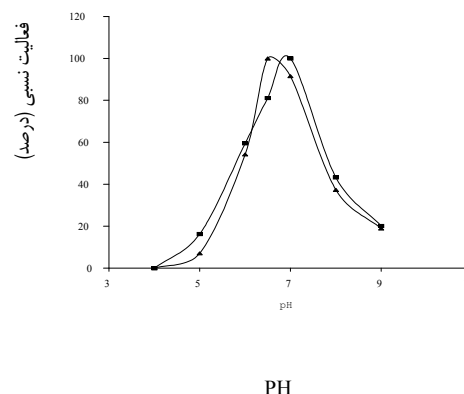
یافته ها

نواحی ضرباندار سلولهای قلبی مشتق از سلولهای بنیادی از روز ۶ به وضوح در زیر میکروسکوپ فاز کنتراست قابل مشاهده است. سلولهای عضله قلبی مشتق از سلولهای بنیادی جنینی و نوزاد موش هر دو از نظر مورفولوژی دارای اشکال دوکی، دو یا سه یا چند گوشه ای همراه با ساختارهای سارکومری موجود در سلولهای عضلانی می باشند. در بررسی فعالیت کاتالیتیکی و ثابتهای سینتیکی آنزیم، مشاهده شد که کراتین کیناز موجود در هر دو نمونه فعالیت مطلوبی داشته و علاوه بر این ایزوفرم قلبی آنزیم (CK_{MB}) نیز فعالیت قابل ملاحظه ای را نشان داد. داده های حاصل از منحنی لینووربرگ آنزیم در شکل ۱ نشان داد که میزان K_m آنزیم CK برای سوبسترای کراتین فسفات در سلولهای عضله قلبی مشتق از سلولهای بنیادی برابر $3/26 \pm 0/26 \text{ mM}$ و در سلولهای عضله قلبی طبیعی برابر $5/67 \pm 0/35 \text{ mM}$ می باشد و علاوه بر این میزان فعالیت ویژه آنزیم CK حاصل از سلولهای عضله قلبی مشتق از سلولهای بنیادی برابر $50/25 \pm 2/21 \mu\text{mol min}^{-1}\text{mg}^{-1}$ و در سلولهای عضله قلبی حاصل از موش برابر $43/48 \pm 2/04 \mu\text{mol min}^{-1}\text{mg}^{-1}$ بود.

بررسی فعالیت آنزیم CK در محدوده pH ۴-۹ بر طبق شکل ۲ نشان داد که pH بهینه در آنزیم CK حاصل از سلولهای عضله قلبی مشتق از سلولهای بنیادی برابر ۶/۵ و در سلولهای قلبی حاصل از نوزاد موش برابر ۷ می باشد علاوه بر این در pH بیشتر از مقدار بهینه، آنزیم حاصل از سلولهای عضله قلبی مشتق از سلولهای بنیادی افت فعالیت شدیدی را نسبت به آنزیم حاصل از سلولهای عضله قلبی نوزاد موش نشان داد.

ویژه آنزیم کراتین کیناز در دو نمونه تا حدی متفاوت بود، Szasz و همکارانش K_m کراتین کیناز را در سرم انسان برابر $1/17 \text{ mM}$ گزارش کرده‌اند. (۱۴) همانطور که می‌دانیم K_m هر آنزیم‌ها تا حدی بیانگر غلظت فیزیولوژیکی سوبسترای آن آنزیم در سلول است (۱۵) و کمتر بودن میزان K_m یک آنزیم نشانه میل ترکیبی بیشتر آن به سوبستراست، که هر یک از این عوامل ذکر شده می‌توانند علت تفاوت مشاهده شده باشند، علاوه بر این در مطالعه روی نمونه‌های طبیعی، بیان شده که متابولیسم انرژی در سلولهای قلب بالغ اساساً هوازی (aerobic) است، در حالی که قلب جنین به شیوه بی‌هوازی (anaerobic) عمل می‌کند. در واقع تغییرات متابولیسم انرژی در سلولهای قلبی پاسخی به فراهم بودن اکسیژن و سوبسترا در شرایط مختلف تکاملی و فیزیولوژیکی بافت است و این مسئله بنوبه خود نوع و میزان بیان ایزوفرم‌های مختلف آنزیم را تحت الشعاع قرار می‌دهد مثلاً گزارش شده که میزان بیان CK_{MB} در قلب جنین بیشتر از فرد بالغ است (۸) و در حملات قلبی نیز افزایش می‌یابد همچنین این ایزوفرم در مقایسه با MM دارای K_m کمتری برای کراتین فسفات می‌باشد. (۹) بنابراین احتمال می‌رود که کمتر بودن K_m آنزیم در نمونه حاصل از سلولهای بنیادی دلیل بیان بیشتر ایزوفرم MB باشد که دارای K_m کمتری است زیرا سلول در بیان ایزوفرم‌های مختلف آنزیمی عملکرد خود را به گونه‌ای تنظیم می‌کند که با شرایط موجود تکاملی و فیزیولوژیکی سازگاری مناسبتری داشته باشد. از طرفی میزان فعالیت ویژه آنزیم‌ها وابسته به میزان بیان ژن آنزیم، اختلاف در بیان فرم‌های ایزوآنزیمی در مراحل مختلف تکامل و وجود و عدم وجود فرم فعال در داخل سلولهای مورد بحث، دلیل مراحل متفاوت تکاملی آنها در شرایط آزمایشگاهی (in vitro) نسبت به مراحل تکوین در بدن موجود زنده (in vivo) است که البته بررسی نوع و میزان بیان ایزوآنزیم‌های مختلف کراتین کیناز موجود در دو نمونه با کمک روش‌های الکتروفورزی، تاییدی بر نتایج حاصل از مطالعات سینتیکی خواهد بود.

دمای پهنه دو نمونه آنزیمی، همانند سایر مطالعات در 35°C بدست آمد. (۱۴) در پایداری حرارتی آنزیم‌ها و ایجاد حداکثر انعطاف پذیری (Flexibility) عوامل مختلفی نقش دارند که از آن



نمودار ۳. پروفایل pH آنزیم کراتین کیناز استخراج شده از سلولهای عضله قلبی مشتق از سلولهای بنیادی جنینی (■) و سلولهای قلبی موش (▲)

بحث

سلولهای بنیادی جنینی پتانسیل بالایی برای کاربردهای درمانی داشته و منبع سلولی نامحدودی را در این زمینه فراهم می‌کنند. بنابراین مطالعات زیادی بر سر امکان استفاده از این سلولها در طب پیوند در حال انجام است.

انجام مطالعات بیوشیمیایی در این سلولها و مقایسه آن با نوع طبیعی، اطلاعات ارزشمندی در مورد وضعیت متابولیسم آنها در اختیار ما قرار می‌دهد و چون آنزیم‌ها از جمله عواملی هستند که در تنظیم هوموستاز محیط داخلی بدن و انجام فعالیت‌های متابولیسمی در سلولها نقش به سزایی را ایفا می‌کنند بنابراین کاندید مناسبی در این زمینه به شمار می‌روند. در بسیاری از مطالعات مشاهده شده که آنزیم کراتین کیناز نقش عمده‌ای در فراهم‌سازی انرژی در سلولهای قلبی دارد و بدین لحاظ از نشانگرهای (Marker) اصلی در بروز حملات قلبی که عمدتاً ناشی از کمبود انرژی در این سلولهاست می‌باشد بنابراین خصوصیات سینتیکی و سایر مشخصات آنزیم کراتین کیناز در برخی بافتها مانند مغز، عضله و قلب در بسیاری از مطالعات مورد بررسی قرار گرفته است. (۱۰) در این مطالعه نیز در بررسی عصاره استخراج شده از دو نمونه مورد بحث، آنزیم کراتین کیناز تام، همچنین ایزوفرم MB فعالیت مطلوبی را نشان دادند که مطالعات انجام شده در زمینه سلولهای قلبی طبیعی نیز این مسئله را تایید می‌کند. (۱۳) K_m و فعالیت

تابتهای سینتیکی دو نمونه مورد بحث، انجام مطالعات گستره‌ای را در زمینه‌های ذکر شده می‌طلبد. بنابراین اهمیت مطالعه حاضر از آن جهت است که خود مقدمه‌ای است که لزوم انجام بررسی‌های تکمیلی را به اثبات می‌رساند.

نتیجه‌گیری: در مجموع کاردیومیوسیت‌های مشتق از سلولهای بنیادی جنینی بعنوان مدلی برای تکوین کاردیومیوسیت‌ها در موجود زنده است، اگر چه این موضوع دارای محدودیتها و چالشهایی نیز است ارزیابی بیشتری در مراحل تکوینی و شرایط مختلف (نظیر حضور فاکتورهای رشد یا ماده زمینه برون سلولی) و مقایسه آن با کاردیومیوسیت‌های مشتق از موجود زنده ضروری است. علیرغم این محدودیتها نتایج ما بعضی از صفات آنزیمی مهم کاردیومیوسیت‌های مشتق از سلولهای بنیادی جنینی را نشان می‌دهد.

References

1. Fijnvandraat AC, van Ginneken AC, de Boer PA, Ruijter JM, Christoffels VM, Moorman AF, Lekanne Deprez RH. Cardiomyocytes derived from embryonic stem cells resemble cardiomyocytes of the embryonic heart tube. *Cardiovasc Res* 2003; 58: 399-409.
2. Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotent 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 cell. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981; 78: 7634-38.
4. Maltsev VA, Wobus AM, Rohwedel J, Bader M, Hescheler J. Cardiomyocytes differentiated in vitro from embryonic stem cell developmentally express cardiac-specific genes and ionic currents. *Circ Res* 1994; 75: 233-244.

جمله می‌توان به ترکیبات آمینواسیدی موجود در ساختارهای هلیکسی آنزیم، برخی موتاسیونها و تاثیر عوامل سیتوپلاسمی موجود در عصاره سلولی اشاره کرد که باعث پایدار کردن ساختار سه بعدی آنزیم‌ها می‌شود. که در مورد نمونه‌های مورد بحث، یکسان بودن دمای بهینه، نشانه پایداری و انعطاف‌پذیری نسبتاً مشابه است.

با توجه به پروفایل pH بدست آمده، آنزیم‌های حاصل از دو نمونه pH بهینه نسبتاً متفاوتی را نشان دادند که البته حداکثر فعالیت برای آنزیم کراتین کیناز در سایر مطالعات نیز در محدوده ۶/۵-۷ گزارش شده است. (۱۵) تاثیر pH بر فعالیت آنزیم ممکن است ناشی از تغییر در بار الکتریکی یک ریشه فعال در جایگاه اتصال به سوپسترا باشد یا اینکه با تغییر pH یک تغییر شکل فضایی در ساختمان آنزیم ایجاد شود، علاوه بر این pH می‌تواند بر میزان یونیزه شدن سوپسترا هم موثر باشد بنابراین تمام این حالات می‌تواند به نوبه خود بر فعالیت آنزیمی تاثیر بگذارد (۱۶) که اختلاف مشاهده شده در pH بهینه دو نمونه مورد نظر، هر یک از موارد ذکر شده را می‌تواند شامل شود.

در بسیاری از مطالعات نتایج حاصل از بیان ژن، الکتروفیزیولوژی و مورفولوژی سلولهای عضله قلبی مشتق از سلولهای بنیادی جنینی مشابه سلولهای قلبی طبیعی در مرحله ابتدایی (early) تکوین قلب می‌باشد (۱)، بنابراین در بسیاری از تحقیقات دانشمندان سعی در ایجاد شرایط کشت مطلوب جهت تولید سلولهای عضله قلبی بالغ از سلولهای بنیادی جنینی دارند. وضعیت متابولیکی سلولهای عضله قلبی مشتق از سلولهای بنیادی جنینی نیز یکی از مهمترین جنبه‌های عملی استفاده از این سلولها جهت جایگزینی سلولهای طبیعی در فرایندهایی نظیر پیوند سلولهای قلبی و سایر مطالعات است اما بدلیل اینکه متابولیسم انرژی در قلب روند پیچیده‌ای است که تغییرات حاصل در آن می‌تواند متاثر از عوامل مختلفی مانند: شرایط فیزیولوژیکی موجود در سلول از نظر فراهم بودن اکسیژن و سوپسترا، عوامل سیتوپلاسمی ناشناخته، میزان بیان ژن پروتئین‌های مختلف و مراحل پیچیده تکاملی از جمله میزان بلوغ میتوکندریها و پیامدهای آن و سایر موارد باشد، درک علت تفاوت‌های مشاهده شده در

5. Maltsev VA, Rohewedel J, Hescheler J, Wobous AM. Embryonic stem cell differentiate in vitro into cardiomyocytes representing sinusnodal, artial and ventricular cell types. *Mech Dev* 1993; 44: 41-50.
6. Kenneth R, Czyn J, Tweedle D, Tian Yang H. Differentiation of pluripotent embryonic stem cell into cardiomyocytes. *Circulation research* 2002; 91:189-201.
7. Decking UM, Alves Ch, Wallimann Th, Wyss M, Schrader J. Functional aspects of creatine kinase isoenzymes in endothelial cells. *Am J Physiol Cells Am J physiol cell physiol* 2001; 281-320-328.
8. Saupe KW, Spindler M, Hopkins JC, Shen W, Ingwall JS. Kinetic, thermodynamic, and developmental consequences of deleting creatine kinase isoenzymes from the heart. Reaction kinetics of the creatine kinase isoenzymes in the intact heart. *J Biol Chem* 2000; 275: 19742-6.
9. Nascimben L, Ingwall JS, Pauletto P, Friedrich J, Gwathmey JK, Saks V, Pessina AC, Allen PD. Creatine kinase system in failing and nonfailing human myocardium. *Circulation* 1996; 94: 1894-901.
10. Dawson DM, Eppenberger HM, Kaplan NO. The coparative enzymology of creatin kinase. II. Physical and chemical properties. *J Biol Chem* 1967; 242(2): 210-217.
11. Baharvand H, Mattaei 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.
12. Chlopcikova S, Psotova J, Miketova P. Neonatal, rat cardiomyocytes-A model for the study of morphological , biochemical and electrophysiological characteristic of the heart. *Biomed. Papers* 2001; 145: 49-55.
13. Van Der Laarse A, Hollar L, Kokshoon LJ, Witteveen S. The activity of cardio-specific isoenzymes of creatine phosphokinase and lactate dehydrogenase in monolayer cultures of neonatal rat heart . *J Mol Cel Cardio* 1979; 11: 501-510.
14. Szasz G, Gruber W, Bernt E. Creatine kinase in serum: I. Determination of optimum reaction condition . *Clin Chem* 1976; 22: 650-6.
15. Devlin MD. Text book of biochemistry, 5th Ed 2002; John Wiley pp. 423.
16. Murray RK, Granner DK, Mayes PA, Rodwell VW. Harper biochemistry, 24 th Ed 1996; Appleton and Lange, Four Stamford Plaza. pp. 81.

