

تأثیر هم‌زمان ۵-Azacytidin و DMSO در القای تمایز کاردیومیوسیت‌ها از سلول‌های کارسینوما جنینی P19 در شرایط آزمایشگاهی

هاتف قاسمی حمیدآبادی Ph.D.^۱، نورا... رضایی Ph.D.^۱، رها سترگ MSc.^۱، سعید عابدیان کناری Ph.D.^۲، مصطفی لطیف‌پور Ph.D.^۳، مجید ملک زاده سفارودی Ph.D.^{۳*}

۱- گروه آناتومی و بیولوژی سلولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
۲- مرکز تحقیقات ایمونوژنتیک، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
۳- گروه آناتومی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
* پست الکترونیک نویسنده مسئول: m.malekzadeh@mazums.ac.ir

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۱/۲۶

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۸/۲۱

چکیده

هدف: در مطالعه حاضر توانایی تمایز سلول‌های کارسینوما جنینی P19 در حضور هم‌زمان ۵-Azacytidin و DMSO به کاردیومیوسیت‌ها مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها: جهت تمایز سلول‌های P19، اجسام شبه جنینی (Embryoid Bodies, EBs) به‌روش قطرات آویزان طی ۲ روز تشکیل شدند. سپس EBs به مدت ۱۰ روز تحت القای ۲ میکرومولار 5-Azacytidin (5-Aza group)، DMSO (DMSO group) ۰/۵ درصد و ترکیب DMSO و 5-Azacytidin (Aza+DM group) قرار گرفتند. طی تمایز تعداد ضربان در دقیقه هر دو روز یکبار در گروه‌های مختلف به‌وسیله میکروسکوپ معکوس شمارش شدند. بیان ژن‌های نظیر (-MHC، -Myosin Heavy Chain، Myosin Light Chain, MLC) و (Connexin-43) به‌وسیله RT-PCR در روز دهم پس از القا بررسی شدند. جهت بیان پروتئین F-actin از ایمونوسیتوشیمی استفاده شد.

نتایج: تغییرات مورفولوژیکی زیادی در کاردیومیوسیت‌های مشتق شده از P19 به‌ویژه در گروه Aza+DM group ایجاد شد به‌طوری‌که افزایش مشخصی در اندازه سیتوپلاسم و زواید سیتوپلاسمی آن‌ها دیده شد و به تدریج شاخه شاخه شدن زوائدشان افزایش یافت و با سلول‌های مجاور ارتباط برقرار کردند. نتایج شمارش روزانه تعداد ضربان در دقیقه در تمامی گروه‌ها از روز ۲+۲ مشاهده شده و تا روز ۲+۸ بتدریج افزایش یافته است. در سلول‌های P19 که تحت القای هم‌زمان DMSO و 5-Aza بودند ژن‌های MLC و MHC بیان شدند. کاردیومیوسیت‌های Aza+DM group پروتئین F-actin را بیان کردند در حالی که این پروتئین در سایر گروه‌ها مشاهده نشد.

نتیجه‌گیری: کاربرد هم‌زمان ترکیبات DMSO و 5-Azacytidin موجب بهینه‌سازی محیط کشت تمایزی کاردیومیوسیت‌ها از سلول‌های P19 می‌گردد.

واژگان کلیدی: Embryoid Bodies، کاردیومیوسیت‌ها، 5-Azacytidin، DMSO

مقدمه

(BMPs) که متعلق به ابرخانواده Transforming Growth

(TGF- Factor) می‌باشند که به واسطه فاکتورهای نسخه‌برداری خاص قلبی در فرآیند قلب‌زایی نقش دارند (۹).

در همین ارتباط Makino S و همکاران (۱۰) گزارش کردند که در صورتی که سلول‌های استرومایی مغز استخوان موش تحت القای ماده محرک ۵-Azacytidin قرار گیرند به سلول‌های قلبی ضربان‌دار تمایز می‌یابند و در ادامه مشخص شده که پیوند سلول‌های مذکور به جایگاه سکنه قلبی، روند بهبودی قلب را افزایش چشمگیری می‌بخشد. علاوه بر این مطالعات مشابهی توسط Shim W و همکاران (۱۱) بر روی سلول‌های استرومایی مغز استخوان انسان صورت پذیرفته است که نشان می‌دهد که نه تنها ۵-Azacytidin بلکه برخی از فاکتورهای رشد نیز می‌توانند سبب تمایز کاردیومیوسیت‌ها گردند.

با توجه به مجموع مطالعاتی که قبلاً در این باره صورت گرفته معلوم شده که هم سلول‌های بنیادی قلبی و هم سلول‌های بنیادی غیرقلبی می‌توانند بعد از پیوند به قلب و یا کشت در شرایط آزمایشگاهی شبیه محیط قلب، به کاردیومیوسیت تبدیل شوند. پیشنهاد شده است که سلول‌های بنیادی، آنژیوژنز را توسط کاردیومیوسیت‌های ایسکمیک شده با ترشح IL6, TNF, CRP تحریک و از مرگ آپوپتیتیک کاردیومیوسیت‌ها جلوگیری می‌کنند و به‌علاوه کاردیومیوسیت‌ها را تحریک به تکثیر می‌کنند (۱۲ و ۱۳).

تا به حال فاکتورهای کاردیومیوژنیک متعددی به‌واسطه مطالعه تکوین قلب در موش شناخته شده است. به‌منظور بهبود بخشیدن به کارایی تمایز کاردیومیوسیت‌ها از برخی از فاکتورها استفاده می‌شود که از جمله این فاکتورها ۵-Azacytidin و DMSO می‌باشند که عمدتاً جهت تمایز در شرایط آزمایشگاهی کاردیومیوسیت‌ها شناخته می‌شود. علاوه بر این گزارشات متعددی ثابت می‌کند که تمایز کاردیومیوسیت‌ها به‌مدت زمان القا و غلظت بستگی دارد. از آنجائی‌که توانایی تمایز کاردیومیوژنیک هر یک از این ترکیبات به‌صورت جداگانه به اثبات رسیده است و با توجه به اینکه تا به حال گزارشی مبنی بر آثار ترکیبی این فاکتورها مشاهده نشده است، به‌نظر می‌رسد که استفاده هم‌زمان از این ترکیبات می‌تواند تأثیر به‌سزایی در القای

از جمله مشکلات بزرگی که امروزه جوامع بشری با آن مواجه است بیماری‌های قلبی - عروقی هستند. در مشکلات ایسکمی عضله قلب که متعاقب سکنه قلبی رخ می‌دهد، سلول‌ها دچار آسیب شده و در عمل‌کرد طبیعی کاردیومیوسیت‌ها اختلال ایجاد می‌شود. با توجه به اینکه کاردیومیوسیت‌های بالغ قادر به بازسازی و ترمیم خود نیستند و از سویی مداخلات کلینیکی متداول هم قادر به کاهش عوارض سکنه قلبی نیستند میزان مرگ و میر در این دسته از بیماران فوق‌العاده زیاد است، لذا یافتن مخزن سلولی در دسترس که بتواند در صورت نیاز به کاردیومیوسیت‌ها متمایز شود و به محل آسیب دیده تزریق گردد، تحولی شگرف را در درمان این بیماران فراهم خواهد نمود (۱-۳).

مطالعات متعددی ثابت کرده‌اند که یک منبع سلولی مناسب جهت درمان این دسته از بیماران بایستی برخی از ویژگی‌ها نظیر دسترسی آسان، تکثیر بالا، مقاوم در برابر شرایط ایسکمیک، عدم برانگیختن پاسخ‌های ایمنی و قابلیت تمایز یافتن به کاردیومیوسیت‌ها را داشته باشد. هر چند که تا به حال منبع سلولی مناسب برای درمان موفق این دسته از بیماران شناخته نشده است (۴-۶). برای مثال علیرغم دسترسی راحت سلول‌های آلوژن مشخص شده است که در صورت پیوند سبب ایجاد واکنش‌های ایمنولوژیک می‌شود. در این بین به‌نظر می‌رسد که به‌کاربردن سلول‌های کارسینوما جنینی (Embryonic Carcinoma cells, ECs) مناسب باشد (۵ و ۷).

سلول‌های کارسینوما جنینی یکی از انواع سلول‌های بنیادی هستند. این سلول‌ها همانند سایر سلول‌های بنیادی نامیرا بوده و قدرت تکثیر بالایی در محیط کشت دارند. یکی از انواع سلول‌های کارسینوما جنینی، P19 می‌باشد که از تراتو کارسینوما القا شده در موش تهیه می‌شود و دارای کاربوتیپ طبیعی هستند. در همین ارتباط، گزارش‌های متعددی وجود دارند مبنی بر اینکه سلول‌های P19 قابلیت تمایز به انواع سلول‌ها از جمله کاردیومیوسیت‌ها را در شرایط آزمایشگاهی دارا هستند و تا حدودی مشکلات موجود را می‌تواند مرتفع کند (۵ و ۸).

فاکتورهای مختلفی در فرآیند القای کاردیومیوژنیک طی دوران جنینی وجود دارند از جمله Bone Morphogenetic Proteins

تمایز کاردیومیوسیت‌ها از سلول‌های P19 در شرایط آزمایشگاهی داشته باشد.

القای اضافه نشد و به‌عنوان گروه کنترل (Co group) در نظر گرفته شد.

مواد و روش‌ها

کشت و تکثیر سلول‌های P19 در این تحقیق از سلول‌های P19 (خریداری شده از انیستیتو پاستور تهران) استفاده شد. محیط کشت این سلول‌ها شامل High Glucose (Gibco) - DMEM که حاوی ۱۵ درصد سرم جنین گاوی (FBS, Gibco, 0.1 Mm, بتامرکاپتواتانول (Sigma)، ۱ درصد پنی‌سیلین/استرپتوماایسین (Gibco) و ۱ درصد اسیدهای آمینه غیر ضروری (Sigma) و ۱ درصد گلوتامین (Gibco) کشت داده شدند. سلول‌ها در انکوباتور 37° با فشار ۵ درصد CO₂ و رطوبت ۹۵ درصد انکوبه شدند. تعویض محیط کشت به‌صورت روزانه صورت گرفته شد.

ارزیابی ضربان کاردیومیوسیت‌های تمایز یافته: پس از شکل‌گیری اجسام شبه جنینی تعداد ضربان در دقیقه طی روزهای ۲+۲، ۲+۴، ۲+۶، ۲+۸، ۲+۱۰ و گروه‌های مختلف به‌وسیله میکروسکوپ معکوس مشاهده و شمارش شدند.

ارزیابی ایمونوسیتوشیمی (Immunocytochemistry): در ابتدا کاردیومیوسیت‌های مشتق شده از سلول‌های P19 در گروه‌های مختلف توسط PBS سه مرتبه شستشو شدند. سلول‌های مذکور در محلول پارافرمالدئید ۴ درصد در دمای اتاق به‌مدت یک شب تثبیت شدند. به‌دنبال شستشوی مجدد سلول‌ها با PBS، سلول‌ها به‌مدت ۶۰ دقیقه در دمای اتاق با سرم بز (Goat serum) پوشانده شدند. سپس در محلول H₂O₂، ۳ درصد قرار داده شدند. آنتی‌بادی اولیه F-actin (Dako) با رقت ۱:۴۰۰ به‌مدت ۴۵ دقیقه به نمونه‌ها افزوده شد و به‌دنبال آن آنتی‌بادی ثانویه EnVision TM (Dako) به‌مدت ۳۰ دقیقه به نمونه‌ها اضافه شد. در نهایت سلول‌ها توسط میکروسکوپ نوری بررسی شدند (۱۵).

شکل‌گیری اجسام شبه جنینی و القای تمایز کاردیوژنیک (Induction of cardiogenic differentiation)

اجسام شبه جنینی (Embryoid Bodies, EBs) بر مبنای روش قطرات آویزان Hanging Drops انجام شد (۱۴). بدین ترتیب سوسپانسیون از سلول‌های P19 ایجاد شد و با شمارش سلولی، تعداد ۲۰۰۰ سلول در هر قطره ۲۰ میکرولیتری (۲۰۰۰ cells/drop) از محیط کشت بر روی درپوش پتری دیش به‌صورت آویزان به‌مدت ۴۸ ساعت در انکوباتور کشت داده شدند. سپس اجسام شبه جنینی توسط میکروسکوپ معکوس (Invert microscope) مورد ارزیابی شدند و اجسام شبه جنینی با ویژگی‌های مناسب جهت ادامه تمایز در نظر گرفته شدند. ضمناً به‌منظور جلوگیری از خشک شدن قطرات، کف دیش‌ها توسط PBS پوشیده شدند. سپس اجسام شبه جنینی به‌مدت ۱۰ روز در محیط‌های القایی مختلف به پلیت باکتریایی که با ژلاتین ۰/۱ درصد (Sigma) ژلاتینه شده، منتقل و در انکوباتور کشت داده شدند. جهت القای تمایز سلول‌ها، از ۲ میکرومولار 5-Azacytidin (Sigma, 5-Aza group)، ۰/۵ درصد DMSO (DMSO group, Sigma) و ترکیب DMSO و 5-Azacytidin (Aza+DM group) استفاده شد. علاوه بر این به برخی چاهک‌های پلیت باکتریایی هیچگونه عامل

آنالیز نسخه برداری معکوس واکنش زنجیره‌ای پلی مرز (RT-PCR): با استفاده از RT-PCR میزان بیان ژن‌های ویژه کاردیومیوسیت‌ها در گروه‌های ذکر شده مورد ارزیابی قرار گرفته شد. بدین ترتیب زنجیره سنگین میوزین (Myosin - Heavy Chain, MHC)، زنجیره سبک میوزین (Myosin - Light Chain, MLC) و کانکسین-43 (Connexin-43) در روز ۱۰ پس از القا بررسی شدند. علاوه بر این ژن actin - نیز به‌عنوان کنترل داخلی در نظر گرفته شد. همچنین از قلب نوزادان موش صحرایی به‌عنوان کنترل مثبت استفاده شد. RNA کل با استفاده از کیت RNX Plus (Fermentas) استخراج شده و با به‌کارگیری پرایمر الیگو dt و آنزیم نسخه‌بردار معکوس MMULV، cDNA ساخته شد. سپس با استفاده از پرایمرهای اختصاصی کاردیومیوسیت‌ها، واکنش PCR انجام شد. (جدول ۱). در نهایت به‌منظور الکتروفور محصولات PCR بروی ژل آگارز ۲ درصد منتقل شده و با دستگاه ترانس لومیناتور UV مشاهده شدند.

جدول ۱: ویژگی‌ها و توالی پرایمرهای ذکر شده در تحقیق حاضر.

Gene	Primer (Forward/Reverse)	Length (bp)
-MHC	F 5'-CTGCTGGAGAGGTTATTCCTCG -3' R 5'- GGAAGAGTGAGCGGGGCATCAAGG-3'	301
MLC	F 5'-TGTGGGTCACCTGAGGCTGTGGTTCAG -3' R 5'-GAAGGCTGACTATGTGTCCGGGAGATGC -3'	189
Connexin-43	F 5'-AGCGCCTTAGGCAAACCTCCTT -3' R 5'- TCTTCCTTTTCGCATCACATAGA-3'	298
- actin	F 5'- CTTCTTGGGTATGGAATCCTG -3' R 5'- GTGTTGGCATAGAGGTCTTTAC -3'	317

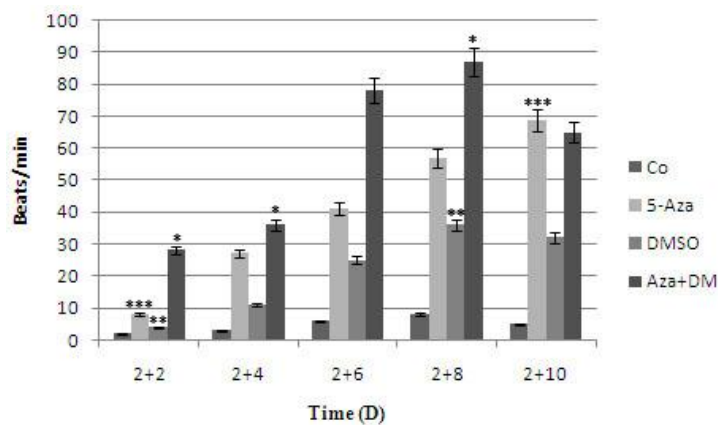
که از روز ۲+۲ تا روز ۲+۱۰ بر میزان تعداد ضربانات آن افزوده شد. یافته‌ها نشان داد که تعداد ضربان در کاردیومیوسیت‌های تمایز یافته در گروه Aza+DM نسبت به سایر گروه‌ها بیشتر بود به طوری که حداکثر ضربان در روز ۲+۸ با میزان ۸۷ ضربان در دقیقه مشاهده شد و با روزهای ۲+۲ و ۲+۴ اختلاف معنی‌داری دارد ($P < 0.05$). علاوه بر این در گروه 5-Aza اختلاف معنی‌داری در فرکانس ضربان در روزهای ۲+۲ و ۲+۱۰ وجود داشت ($P < 0.05$). حداکثر تعداد ضربان در گروه DMSO در روز ۲+۸ مشاهده شد که فقط با روز ۲+۲ اختلاف معنی‌داری دارد ($P < 0.05$) (نمودار ۱).

آنالیز آماری: تعداد ضربان کاردیومیوسیت‌ها در گروه‌های مختلف با استفاده از آزمون واریانس یک‌طرفه One Way ANOVA و نرم افزار آماری SPSS ارزیابی شد. $P < 0.05$ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

نتایج

تمایز سلول‌های P19 به کاردیومیوسیت‌ها

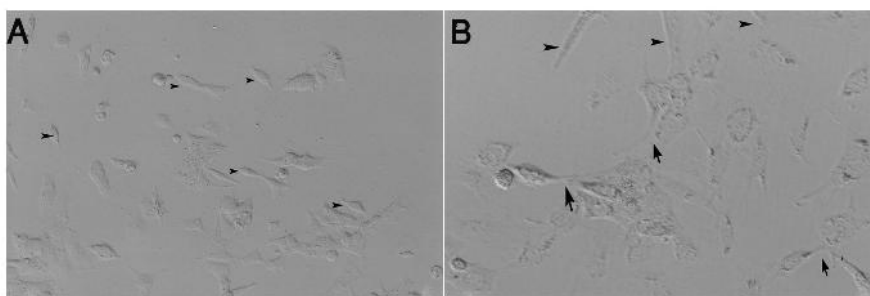
تعداد ضربان در دقیقه در تمامی گروه‌ها از روز ۲+۲ مشاهده شده و تا روز ۲+۸ به تدریج افزایش یافته اما در روز ۲+۱۰ از میزان تعداد ضربانات کاسته شده است به استثنای گروه 5-Aza



نمودار ۱: تعداد ضربان در دقیقه در گروه‌های کنترل (Co)، 5-Aza، DMSO و Aza+DM ($P < 0.05$).

مشخصی در اندازه سیتوپلاسم و زواید سیتوپلاسمی آن‌ها دیده شد و به تدریج تا روز ۲+۱۰ اندازه سلول‌ها و شاخه شاخه شدن آن‌ها افزایش یافت و به صورت گرد یا چندوجهی ظاهر گردیده و با سلول‌های مجاور ارتباط برقرار کردند (شکل ۱، B).

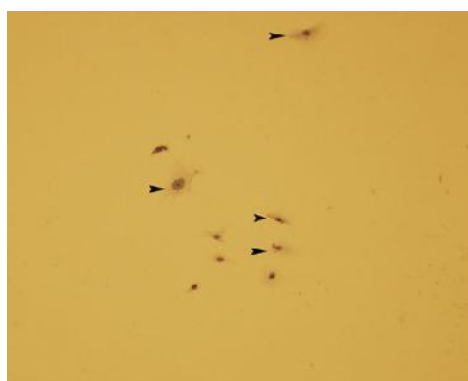
در گروه کنترل کاردیومیوسیت‌های مشتق شده از P19 شکل فیبروبلاستی خود را حفظ کرده بودند (شکل ۱، A). در حالی که تغییرات مورفولوژیکی زیادی در کاردیومیوسیت‌های مشتق شده از P19 ایجاد شد به طوری که طی روزهای ۲+۲ تا ۲+۴ افزایش



شکل ۱: (A) تغییرات مورفولوژیکی حاصله در کاردیومیوسیت‌های مشتق شده از *P19*، در گروه کنترل به شکل فیبروبلاستی مشاهده می‌شوند (سر پیکان‌ها)، (B) بزرگنمایی $\times 10$ ، در گروه *Aza+DM* سلول‌ها عمدتاً به صورت چندوجهی ظاهر گردیده (سر پیکان‌ها) و با سلول‌های مجاور ارتباط تنگاتنگی برقرار کردند (پیکان‌های کوتاه)، بزرگنمایی $\times 20$.

پروتئین اختصاصی قلبی F-actin می‌باشند و سلول‌های F-actin مثبت با ظاهری مشخص و سیتوپلاسم واضح از سلول‌های F-اکتین منفی مشخص هستند (شکل ۲).

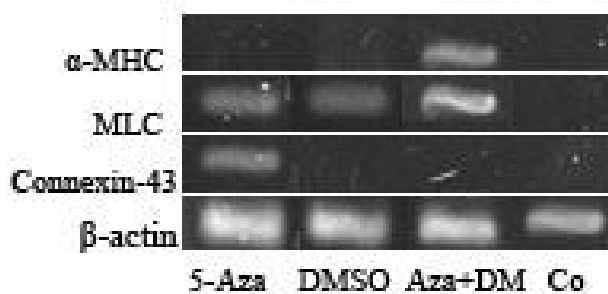
علاوه بر این نتایج حاصل از ارزیابی ایمونوسیتوشیمی ثابت کرد که کاردیومیوسیت‌های مشتق شده از *P19* که تحت القای همزمان *DMSO* و *5-Azacytidin* قرار گرفته‌اند قادر به بیان



شکل ۲: سلول‌های بیان کننده F-اکتین (سر پیکان‌ها)، بزرگنمایی $\times 20$.

MLC بروز یافت. سلول‌های *P19* که تحت القای همزمان *DMSO* و *5-Aza* بودند ژن‌های ویژه بافت قلبی را نظیر *MLC* و *MHC* - بیان کردند (شکل ۳).

آنالیز نتایج RT-PCR نشان داد که در سلول‌های *P19* که به وسیله *5-Aza* تیمار شده‌اند ژن‌های *Connexin-43* و *MLC* بیان شدند. اما در گروهی که به وسیله *DMSO* تیمار شده ژن



شکل ۳: ارزیابی بیان ژن‌های اختصاصی قلبی در گروه‌های *5-Aza*، *DMSO*، *Aza+DM* و کنترل (*Co*) با روش RT-PCR ژن *actin* - به عنوان کنترل داخلی در نظر گرفته شد.

بحث

فاکتورهای نسخه برداری قلبی نظیر Nkx2.5 نقش به‌سزایی دارند. یکی از شناخته شده ترین مسیرهای سیگنالی به Wnt catenin بر می‌گردد. در همین ارتباط Cohen و همکاران (۹)، Marvin و همکاران (۲۲) و Tzahor و همکاران (۲۳) گزارش کردند که در صورت افزودن DMSO، ۱ درصد به‌همراه Fibroblast Growth Factor 8 (FGF8) سلول‌های PC19CL6 در روز اول سبب بیان Wnt3A و Wnt8 می‌گردد اما در روز چهارم از میزان بیان پروتئین‌های سیگنالینگ مذکور کاسته شده است به‌نظر می‌رسد که این فرایند جهت مراحل بعدی تمایز کاردیومیوسیت‌ها ضروری باشد.

در تحقیق حاضر علاوه بر این جهت تمایز سلول‌های P19 به کاردیومیوسیت‌ها از غلظت ۰/۵ درصد DMSO استفاده شد. یافته‌های به‌دست آمده نشان داد که کاردیومیوسیت‌های مشتق شده از لحاظ مورفولوژیک همانند سلول‌های قلبی هستند. آنالیز نتایج RT-PCR نشان داد که سلول‌های تمایز یافته قادر به بیان ژن MLC هستند و حداکثر تعداد ضربان در این گروه در روز ۲+۸ مشاهده شد که در مقایسه با سایر گروه‌ها از فرکانس کمتری برخوردار بود.

در پژوهش حاضر نیز شاید علت بی‌تاثیر بودن غلظت DMSO، ۰/۵ درصد جهت تمایز سلول‌های قلبی از سلول‌های P19 این باشد که DMSO به‌تنهایی نمی‌تواند در القای فرایند کاردیوژنیک نقش داشته باشد. بنابراین به‌نظر می‌رسد که این فرایند نیاز به همکاری برخی از مسیرهای سیگنالی باشد که در اثر افزودن ترکیبات مورد نظر به محیط کشت سلول‌ها ایجاد می‌شوند. علاوه بر این گزارشات مشابهی در این زمینه وجود دارد، به‌طوری‌که تیمار سلول‌های کارسینومای جنینی موشی و حتی سلول‌های بنیادی جنینی در حضور هم‌زمان اکسی‌توسین و DMSO روند تمایز قلبی را تحریک و تسهیل می‌نماید (۲۴) و (۲۵).

در مطالعه حاضر مشخص شده است که هر یک از عوامل القاگر 5-Azacytidine و DMSO به‌تنهایی قادر به تمایز کاردیومیوسیت‌ها از سلول‌های P19 نیستند. اگر چه که مطالعات پیشین حاکی از آن است که افزودن هر یک از این ترکیبات در شرایط آزمایشگاهی می‌تواند تا حدودی برخی از ویژگی‌های کاردیومیوسیت‌ها را بروز دهند.

با توجه به اینکه تمایز کاردیومیوسیت‌ها از سلول‌های سرطانی P19 اهمیت ویژه‌ای در شناخت مکانیسم‌های دخیل در بیولوژی تکاملی، پیوند سلولی و درمان دارد لذا دانستن شرایط کشت مطلوب این سلول‌ها جهت القای تمایز به رده سلولی خاص از جمله کاردیومیوسیت‌ها ضروری می‌باشد. در مطالعه حاضر با به‌کارگیری عوامل القاگر مختلف سعی شده تا ویژگی‌های کاردیومیوسیت‌های تمایز یافته معین گردد (۶، ۱۶-۱۹).

به‌منظور ایجاد تمایز در سلول‌های P19 از غلظت ۲ میکرومولار 5-Azacytidin استفاده شد نتایج نشان داد که سلول‌های تمایز یافته از لحاظ مورفولوژیکی مشابه کاردیومیوسیت‌ها هستند و برخی از ژن‌ها نظیر Connexin-43 و MLC را بروز دادند درحالی‌که هیچ سلول بیان کننده F اکتین مشاهده نشد. همچنین تعداد ضربان به‌تدریج از روز ۲+۲ تا ۲+۱۰ افزایش یافته است. در مطالعه‌ای که Wang و همکارانش (۱۳) به‌منظور تمایز دادن سلول‌های ماتریکس بند ناف انسان انجام دادند توانستند بعد از انکوبه کردن این سلول‌ها با 5-Azacytidin برای ۳ هفته، مارکرهای کاردیومیوسیتی را شامل تروپونین آقلبی، کانکسین 43 و دسمین را بیان کنند و مورفولوژی میوسیت قلبی را مشاهده کنند.

در همین ارتباط گزارش‌های وجود دارد بر اینکه القا سلول‌های استرومایی مغز استخوان با استفاده از داروی 5-Azacytidine به غلظت ۱۰ میکرومولار طی دو هفته جهت تمایز به کاردیومیوسیت‌ها کافی نمی‌باشد و در ادامه بررسی‌ها مشخص شد که سلول‌های مذکور هیچگونه ساختارهای سارکومریک که از ویژگی‌های بارز سلول‌های قلبی است را بروز ندادند (۲۰ و ۲۱). گزارش مشابهی توسط Martin Rendom و همکاران (۱۵) وجود دارد مبنی بر اینکه تمایز سلول‌های استرومایی مغز استخوان به کاردیومیوسیت‌ها در غلظت‌های مختلف داروی مذکور صورت نمی‌پذیرد. نتایج مطالعات فوق نشان می‌دهد که داروی مذکور به‌تنهایی جهت القای تمایز سلول‌های P19 به سلول‌های قلبی کافی نیست بنابراین افزودن عامل القاگر دیگر نیز به محیط کشت سلول‌ها ضروری می‌باشد. تحقیقات اخیر نشان داد که اعضای ابر خانواده TGF- از طریق برخی مسیرهای سیگنالی در القای تمایز کاردیومیوسیت‌ها و

نتیجه گیری

با توجه به مشاهدات انجام شده در این تحقیق و مقایسه آن با سایر مطالعات می‌توان نتیجه گرفت که سلول‌های کارسینومای P19 یکی از بهترین رده‌ها جهت تمایز کاردیومیوسیت‌ها می‌باشند. به طوری که کاربرد هم‌زمان ترکیبات DMSO و 5-Azacytidin موجب بهینه سازی محیط کشت تمایزی کاردیومیوسیت‌ها از سلول‌های P19 می‌گردد.

منابع

- Rosenstrauch D, Poglajen G, Zidar N, Gregoric ID. Stem cell therapy for ischemic heart failure. *Texas Heart Institute Journal*. 2005; 32(3): 339-347.
- Wang J-S, Shum-Tim D, Galipeau J, Chedrawy E, et al. Marrow stromal cells for cellular cardiomyoplasty: feasibility and potential clinical advantages. *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery* 2000; 120(5): 999-1006.
- Gepstein L, Ding C, Rehemedula D, Wilson EE, et al. In vivo assessment of the electrophysiological integration and arrhythmogenic risk of myocardial cell transplantation strategies. *Stem Cells*. 2010; 28(12): 2151-2161.
- Barbash IM, Chouraqui P, Baron J, Feinberg MS, et al. Systemic delivery of bone marrow-derived mesenchymal stem cells to the infarcted myocardium feasibility, cell migration, and body distribution. *Circulation* 2003; 108(7): 863-868.
- McBurney MW, Rogers BJ. Isolation of male embryonal carcinoma cells and their chromosome replication patterns. *Developmental biology*. 1982; 89: 503-508.
- Zwi-Dantsis L, Huber I, Habib M, et al. Derivation and cardiomyocyte differentiation of induced pluripotent stem cells from heart failure patients. *European Heart Journal* . 2012; 10: 1093.
- Martin GR. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1981; 78 (12): 7634-7638..
- Motamedi R, Azadbakht M, Fathi F, Amini A, et al. In Vitro Differentiation of Human Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells into Cardiomyocyte-like Cells. *Yakhteh*. 2010; 12(3): 387-394.

در ادامه مطالعه به منظور بهینه سازی شرایط محیط کشت تمایزی کاردیومیوسیت‌ها از تاثیر هم‌زمان ترکیبات DMSO و 5-Azacytidin استفاده شد. بررسی‌های میکروسکوپی نشان داد که اولاً این سلول‌ها بیشتر به کاردیومیوسیت تمایز پیدا کرده‌اند تا سلول‌های عضلانی دیگر ثانیاً بیان F اکتین در کاردیومیوسیت‌ها نشانگر این است که سلول‌های تمایز یافته واجد یک الگوی اتصال سلولی مشابه کاردیومیوسیت‌ها می‌باشند. یافته‌های RT-PCR نشان داد که ژن‌های ویژه بافت قلبی نظیر MLC و MHC- در کاردیومیوسیت‌ها بیان شدند. یکی از ویژگی‌های اصلی کاردیومیوسیت‌ها پیدایش ضربان در آن‌هاست. یافته‌های به دست آمده نشان داد که میزان انقباض پایه در دامنه ۲۸ تا ۸۷ ضربان در دقیقه بوده که به ترتیب در روزهای ۲+۲ و ۲+۸ مشاهده گردید. علاوه بر این مشخص شد که تعداد ضربان در این گروه نسبت به سایر گروه‌ها بیشتر بود که دال بر وجود کانال‌های کلسیمی نوع L وابسته به ولتاژ (Ica) در کاردیومیوسیت‌های مشتق شده است. نتایج مشابهی در این زمینه وجود دارد مبنی بر اینکه در حضور ایزوپرنالین کاردیومیوسیت‌های ضربان‌دار مشاهده می‌شود (۲۶). کاردیومیوسیت‌های تمایز یافته دارای الگوی انقباضی پیوسته می‌باشند که به برخی از مولکول‌های چسبنده نظیر N-cadherin، پروتئین‌های اتصالات شکافدار مثل کانکسین ۴۳ و یون کلسیم وابسته است. یکی از دلایل احتمالی در افزایش بیشتر ضربان در گروه Aza+DM نسبت به سایر گروه‌ها به حضور DMSO در محیط القایی بر می‌گردد به طوری که DMSO سبب آزاد شدن ناگهانی یون کلسیم از ذخایر داخل سلولی می‌شود (۲۱). علاوه بر این 5-Azacytidin نیز با ایجاد کمپلکس‌های پایدار سبب دمتیله شدن DNA می‌شود و بدین ترتیب در روند کاردیومیوسیت‌ریس نقش دارد هر چند تمایز سلول‌ها P19 به کاردیومیوسیت‌ها به مدت زمان القا و غلظت بستگی دارد. در همین ارتباط مطالعات نشان می‌دهند که اضافه کردن 5-Azacytidin منجر به افزایش بیان ژن‌های زنجیره سنگین میوزین شود که با نتایج تحقیق حاضر مطابقت دارد (۲۷-۲۹). حتی وجود سرم در محیط کشت بر روی تمایز کاردیومیوسیت‌ها تاثیر می‌گذارد به طوری که حذف سرم سبب افزایش تعداد نواحی ضربان‌دار در اجسام شبه جنینی می‌گردد (۷).

9. Cohen ED, Tian Y, Morrisey EE. Wnt signaling: an essential regulator of cardiovascular differentiation, morphogenesis and progenitor self-renewal. *Development*. 2008; 135(5): 789-798.
10. Makino S, Fukuda K, Miyoshi S, Konishi F, et al. Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells in vitro. *Journal of Clinical Investigation* 1999; 103(5): 697-705.
11. Shim WS, Jiang S, Wong P, Tan J, et al. Ex vivo differentiation of human adult bone marrow stem cells into cardiomyocyte-like cells. *Biochemical and biophysical research communications* 2004; 324(2): 481-488.
12. Oh H, Bradfute SB, Gallardo TD, Nakamura T, et al. Cardiac progenitor cells from adult myocardium: homing, differentiation, and fusion after infarction. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2003; 100: 12313-12318.
13. Wang HS, Hung SC, Peng ST, Huang CC, et al. Mesenchymal stem cells in the Wharton's jelly of the human umbilical cord. *Stem Cells* 2004; 22(7): 1330-1337.
14. Hamidabadi HG, Pasbakhsh P, Amidi F, Soleimani M, et al. Functional Concentrations of BMP4 on Differentiation of Mouse Embryonic Stem Cells to Primordial Germ Cells. *IJFS*. 2011; 5: 104-109.
15. Martin Rendon E, Sweeney D, Lu F, Girdlestone J, et al. 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: 137-148.
16. Dambrot C, Passier R, Atsma D, Mummery C. Cardiomyocyte differentiation of pluripotent stem cells and their use as cardiac disease models. *Biochem J*. 2011; 434(1): 25-35.
17. Baharvand H, Azarnia M, Parivar K, Ashtiani SK. The effect of extracellular matrix on embryonic stem cell-derived cardiomyocytes. *J mol and cell cardiol*. 2005; 38(3): 495-503.
18. Kehat I, Kenyagin-Karsenti D, Snir M, Segev H, et al. Human embryonic stem cells can differentiate into myocytes with structural and functional properties of cardiomyocytes. *Journal of Clinical Investigation* 2001; 108: 407-414.
19. Huber I, Itzhaki I, Caspi O, Arbel G, et al. Identification and selection of cardiomyocytes during human embryonic stem cell differentiation. *The FASEB Journal* 2007; 21: 2551-2563.
20. Antonitsis P, Ioannidou-Papagiannaki E, Kaidoglou A, Papakonstantinou C. In vitro cardiomyogenic differentiation of adult human bone marrow mesenchymal stem cells the role of 5-azacytidine. *Interactive cardiovascular and thoracic surgery*. 2007; 6(5): 593-597.
21. Balana B, Nicoletti C, Zahanich I, Graf EM, et al. 5-Azacytidine induces changes in electrophysiological properties of human mesenchymal stem cells. *Cell Research*. 2006; 16: 949-960.
22. Marvin MJ, Di Rocco G, Gardiner A, Bush SM, et al. Inhibition of Wnt activity induces heart formation from posterior mesoderm. *Genes & development*. 2001; 15: 316-327.
23. Tzahor E, Lassar AB. Wnt signals from the neural tube block ectopic cardiogenesis. *Genes & development*. 2001; 15: 255-260.
24. Klug MG, Soonpaa MH, Koh GY, Field LJ. Genetically selected cardiomyocytes from differentiating embryonic stem cells form stable intracardiac grafts. *Journal of Clinical Investigation*. 1996; 98(1): 216-224.
25. Segev H, Kenyagin Karsenti D, Fishman B, Gerecht Nir S, et al. Molecular analysis of cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells. *Development, growth & differentiation* 2005; 47(5): 295-306.
26. Xu W, Zhang X, Qian H, Zhu W, et al. Mesenchymal stem cells from adult human bone marrow differentiate into a cardiomyocyte phenotype in vitro. *Experimental Biology and Medicine*. 2004; 229: 623-631.
27. Cai C-L, Liang X, Shi Y, Chu P-H, et al. Isl1 identifies a cardiac progenitor population that proliferates prior to differentiation and contributes a majority of cells to the heart. *Developmental cell*. 2003; 5: 877-889.
28. Xu C, Police S, Rao N, Carpenter MK. Characterization and enrichment of cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells. *Circulation research*. 2002; 91(6): 501-508.
29. Snir M, Kehat I, Gepstein A, Coleman R, et al. Assessment of the ultrastructural and proliferative properties of human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 2003; 285(6): H2355-H2363.

The Concurrent Effect of 5-Azacytidin and DMSO on In Vitro Differentiation Induction of Cardiomyocytes from Embryonic Carcinoma cells P19

Ghasemi Hamidabadi H, Ph.D.¹, Rezaei N, Ph.D.¹, Setorg R MSc¹, Abediankenari S, Ph.D.²,
Latifpour M, Ph.D.³, Malekzadeh Shafarudi M, Ph.D.^{1*}

1. Department of Anatomy and Cell Biology, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

2. Immunogenetic Research Center, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

3. Department of Anatomy, Faculty of Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

* Email corresponding author: m.malekzadeh@mazums.ac.ir

Received: 12 Nov. 2013

Accepted: 15 Apr. 2014

Abstract

Aim: In current study capability of differentiation of embryonic carcinoma cells P19 to cardiomyocyte through inducing effects of DMSO and 5-Azacytidin individually or in combinative form in laboratory condition were examined.

Material and Methods: In order to differentiate induction of P19, Embryoid Bodies (EBs) formed through hanging drops method during two days. Then EBs have induced by 2 μ M of 5-Azacytidin (5-Aza group), 0/5% DMSO (DMSO group) or both 5-Azacytidin and DMSO (Aza+DM Group) during ten more days. During differentiation beating number per minute counted every two days in all groups by invert Microscopy. Gene expression such as: -Myosin Heavy Chain (-MHC) and Myosin Light Chain (MLC) and Connexin-43 have examined by RT-PCR in last day. To more accuracy, F-actin protein expression also illustrated through immunocytochemistry method.

Results: Morphological changes in differentiated cardiomyocytes derived from P19 illustrated in all groups. However the most changes such as significant increasing in size and number of process, their branches and attachment between branches happened in Aza+DM group. Daily beating counter per minute revealed increasing in beating number from 2+2 to 2+8 in all groups. RT-PCR analysis also revealed expression of both -MHC and MLC in Aza+DM Group. However, F-action has expressed only in Aza+DM group.

Conclusion: The Results have shown combination of two 5-Azacytidin and DMSO inducer caused effective cell culture differentiate of P19 to cardiomyocyte.

Keywords: P19 Cells, Cardiomyocytes, 5-Azacytidin, DMSO