تأثیر DMSO در القای تمایز کاردیومیوسیت ها از سلول های کارسینومای جنینی P۱۹در شرایط آزمایشگاهی

مجید ملک زاده شفارودی[۱]، نوراله رضایی[۱]، سعید عابدیان کناری[۲]، رها سترگ[۱]، مصطفی لطیف پور[۳]، هاتف قاسمی حمیدآبادی[*۱]

۱) گروه علوم تشریح 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 علوم تشریح، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

تاریخ دریافت:۹۲/۱۲/۱۳ تاریخ پذیرش: ۹۳/۳/۲۰

چکیده

مقدمه: در مطالعه حاضر توانایی تمایز سلول های کارسینومای جنینی P_{19} در غلظت های مختلف DMSO به کاردیومیوسیت ها مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روش ها: جهت تمایز سلول های P_{19}، اجسام شبه جنینی(Embryoid Bodies,EBs) به روش قطرات آویزان طی ۲ روز تشکیل شدند. سپس EBs به مدت ۱۸ روز تحت القائات غلظت های مختلف DMSO ۰/۱ درصد، ۰/۵ درصد، ۱ درصد، ۱/۵ درصد، ۲ درصد قرار گرفتند. طی تمایز تعداد ضربان در دقیقه هر سه روز یک بار در گروه های مختلف با میکروسکوپ معکوس شمارش شدند. جهت شناسایی بیان پروتئین F-actin از ایمونوسیتوشیمی استفاده شد.

یافته های پژوهش: تغییرات مورفولوژیکی زیادی در کاردیومیوسیت های مشتق شده از P_{19} به ویژه در گروه DMSO ۰/۵ درصد ایجاد شد به طوری که افزایش مشخصی در اندازه سیتوپلاسم و زواید سیتوپلاسمی آن ها دیده شد. نتایج شمارش روزانه نشان داد که حداکثر تعداد ضربان در دقیقه در غلظت ۰/۵ درصد و در روز ۱۲+۲ (۲ روز برای تشکیل اجسام شبه جنینی به علاوه ۱۲ روز پس از القای تمایز) مشاهده شد. علاوه بر این کاردیومیوسیت تمایز یافته پروتئین F-actin را تنها در حضور غلظت ۰/۵ درصد DMSO بیان کردند در حالی که این پروتئین در سایر غلظت ها بیان نشد.

بحث و نتیجه گیری: یافته های پژوهش حاضر پیشنهاد می نماید که اولاً موثرترین غلظت DMSO در فرآیند القای کاردیوژنزیس غلظت۰/۵ درصد است. ثانیاً یکی از مطلوب ترین رده های سلولی جهت تمایز کاردیومیوسیت ها، سلول های کارسینومای P_{19} می باشد.

واژه های کلیدی: سلول های P۱۹، کاردیومیوسیت ها، پروتئین F-actin، اجسام شبه جنینی، DMSO

[*] **نویسنده مسؤول:** گروه علوم تشریح و بیولوژی سلولی، دانشکده پزشکی ، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

Email: hatefdr@gmail.com

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2023-03-21]

مقدمه

بیماری های قلبی– عروقی در قرن بیست یکم بیشترین نقش را در کوتاه کردن عمر انسان در جوامع صنعتی و در حال توسعه به خود اختصاص داده اند. سلول های قلبی ایسکمیک به سرعت دچار ضایعه شده و می میرند و آن دسته از آن ها که در حاشیه ناحیه ایسکمیک زنده مانده اند، اغلب به واسطه فیبریلاسیون عملکرد طبیعی خود را از دست می‌دهند. از آن جایی که کاردیومیوسیت های بالغ قادر به بازسازی و ترمیم خود نیستند، میزان مرگ و میر در بیماران MI فوق‌العاده زیاد است؛ در این شرایط یافتن مخزن سلولی در دسترس از کاردیومیوسیت متمایز و جوان برای تزریق آن ها به محل آسیب بافتی، تحولی شگرف را در درمان این بیماران و افزایش امید به زندگی متعاقب آسیب وسیع بافت عضلانی قلب فراهم خواهد نمود(۳-۱). سلول های بنیادی جنینی مشتق از توده سلولی داخلی جنین در مرحله بلاستوسیست پر توان بوده و می توانند سلول های هر سه لایه زایای اکتودرم، مزودرم و اندودرم جنینی را تولید نمایند. این سلول ها می توانند بسته به تحریکات داخل سلولی و یا عوامل موجود در محیط کشت دو سرنوشت مجزا و متفاوت پرتوانی و یا تمایز را انتخاب نمایند. سلول های بنیادی جنینی در محیط کشت اختصاصی تحت شرایط فیزیولوژیکی خاص به انواع سلول ها با عملکردهای تخصصی نظیر سلول های عضله قلبی، سلول های مولد انسولین، سلول های عصبی، فیبروبلاست، عضله اسکلتی، عضله صاف و یا انواع دیگر سلول ها تمایز می یابند(۴).

تحقیقات وسیعی بر روی سلول های بنیادی جهت تمایز آن ها به سلول های مختلف و به کارگیری آن ها در درمان بیماری ها به عمل آمده است(۵). برخی از فاکتورها نظیر لایه تغذیه کننده جنینی و فاکتور ممانعت کننده لوکمیایی(LIF) باعث حفظ خاصیت خودبازسازی و پرتوانی در سلول های بنیادی جنینی می شوند به طوری که حذف این فاکتورها از محیط کشت، سلول های بنیادی جنینی شروع به تمایز یافتن به سلول های هر سه لایه زایای جنینی می نمایند(۳). علی‌رغم دسترسی آسان سلول های آلوژن، در صورت پیوند، سبب ایجاد واکنش های ایمونولوژیک می شوند. به نظر می رسد که به کار بردن سلول های کارسینومای جنینی (Embryonic Carcinoma Cells, ECs) گزینه ای مناسب باشد(۸-۶). یکی از انواع سلول های کارسینومای جنینی، P_{19} می-باشد که از تراتو کارسینومای القاء شده در موش تهیه می شود ولی دارای کاریوتیپ طبیعی است. در همین ارتباط گزارشات متعددی وجود دارند مبنی بر این که سلول های P_{19} قابلیت تمایز به انواع سلول ها از جمله کاردیومیوسیت ها را در شرایط آزمایشگاهی دارا هستند. بنا بر این این سلول ها قادرند به عنوان مدل مناسبی برای مطالعه تمایز به کاردیومیوسیت ها در شرایط آزمایشگاهی محسوب گردند(۹،۱۰). مجموع مطالعات گذشته بر روی سلول های بنیادی قلبی و هم سلول های بنیادی غیر قلبی نشانگر توانایی آن ها متعاقب تاثیر القاء کننده های مناسب به کاردیومیوسیت بعد از پیوند به قلب و یا کشت در شرایط آزمایشگاهی مشابه محیط قلب است. به نظر می رسد که سلول های بنیادی، آنژیوژنز را با ترشح IL6, TNF, CRP تحریک و از مرگ آپوپتیتک کاردیومیوست ها جلوگیری به عمل آورده و به علاوه کاردیومیوسیت ها را نیز تحریک به تکثیر می کنند(۱۱،۱۲).

کاردیومیوسیت های تمایز یافته دارای الگوی انقباضی پیوسته می باشند که به برخی از مولکول های چسبنده نظیر N-cadherin، پروتئین های اتصالات شکاف دار مثل کانکسین-۴۳ و یون کلسیم وابسته است. در این میان به نظر می رسد که کاربرد DMSO در محیط کشت سلولی سبب آزاد شدن ناگهانی یون کلسیم از ذخایر داخل سلولی می گردد. این پدیده خود اثر القایی بارزی را بر سلول های در حال تمایز تحمیل می نماید که به فرآیند سیگنالینگ کلسیمی موسوم است(۱۳).

تاکنون فاکتورهای کاردیومیوژنیک متعددی به واسطه مطالعه تکوین قلب در موش شناسایی گردیده است. به منظور بهبود بخشیدن به کارایی تمایز کاردیومیوسیت ها به سلول های قلبی ضربان دار می توان از القاء کننده های سلولی هم چون اکسی توسین، آزوسایتیدین و دی متیل سولفوکساید بهره جست. این دسته از القاء کننده های تمایز سلولی عمدتاً جهت تمایز در شرایط آزمایشگاهی به کاردیومیوسیت ها شناخته می شوند. علاوه بر این مشخص گردیده که تمایز کاردیومیوسیت ها به مدت زمان القاء و غلظت ترکیب شیمیایی القاء کننده بستگی دارد. توانایی تمایز کاردیومیوژنیک هر یک از این ترکیبات به صورت جداگانه به اثبات رسیده است. چنین به نظر می رسد که استفاده هم زمان از این ترکیبات القاء کننده تمایز سلولی می تواند تاثیر به سزایی در القای تمایز کاردیومیوسیت ها از سلول های P_{19} در شرایط آزمایشگاهی داشته باشد. در این مطالعه، سلول های P_{19} کشت و تکثیر داده شدند و سپس تحت اثر دی متیل سولفوکساید در مسیر تمایز به سلول های قلبی

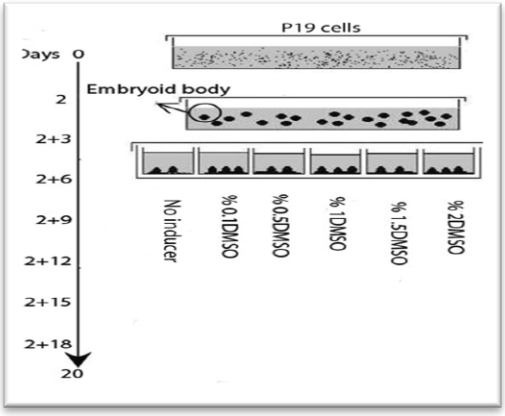
[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2023-03-21]

قرار گرفتند. پس از تشکیل اجسام شبه جنینی و القاء سلول ها با DMSO به مدت ۱۸روز، اجسام شبه جنینی به پلیت های سلولی منتقل شده و کلنی های حاصل توسط میکروسکوپ معکوس از نظر تعداد ضربان، مورفولوژی سلولی و ایجاد ارتباطات میان سلول های تمایز یافته مورد بررسی قرار گرفتند. هدف از اجرای این تحقیق یافتن موثرترین غلظت DMSO در ایجاد تمایز سلولی به کاردیومیوسیت ها با حداکثر تعداد ضربانان موثر و مداوم در راستای تشکیل پروتئین میوفیلامنت انقباضی F-actin در درون سلول های تمایز یافته از اجسام شبه جنینی حاصل از تکثیر سلول های کارسینومای جنینی P_{19} است.

مواد و روش ها

کشت و تکثیر سلول های P_{19} : در این تحقیق از سلول های P_{19} (خریداری شده از انیستیتو پاستور تهران) استفاده شد. محیط کشت این سلو ل ها شامل High DMEM–Glucose (Gibco) که حاوی ۱۵ درصد سرم جنین گاوی(FBS, Gibco)، ۰/۱ Mm بتا مرکاپتو اتانول(Sigma)، ۱ درصد پنی سیلین/استرپتومایسین (Gibco، ۱ درصد اسیدهای آمینه غیر ضروری(Sigma) و ۱ درصد گلوتامین(Gibco) کشت داده شدند. سلول ها در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد با فشار CO_2 ۵ درصد و رطوبت ۹۵ درصد انکوبه شدند. تعویض محیط کشت به صورت روزانه انجام شد.

شکل گیری اجسام شبه جنینی (Embryoid Bodies, EBs) و القاء تمایز کاردیوژنیک (Induction of cardiogenic differentiation): شکل گیری اجسام شبه جنینی بر مبنای روش قطرات آویزان(Hanging Drops) انجام شد(۲). بدین ترتیب سوسپانسیونی از سلول های P_{19} ایجاد شد و با شمارش سلولی، تعداد ۱۰۰۰ سلول در هر قطره ۲۰ میکرولیتری(۱۰۰۰ cells/drop) از محیط کشت بر روی درپوش پتری دیش به صورت آویزان به مدت ۴۸ ساعت در انکوباتور کشت داده شدند. سپس اجسام شبه جنینی توسط میکروسکوپ معکوس (Invert Microscope) مورد ارزیابی شدند و اجسام شبه جنینی با ویژگی های مناسب جهت ادامه تمایز در نظر گرفته شدند. ضمناً به منظور جلوگیری از خشک شدن قطرات، کف دیش ها توسط PBS پوشیده شدند. اجسام شبه جنینی به مدت ۱۸ روز در محیط های القایی مختلف به پلیت باکتریایی که با ژلاتین ۰/۱ درصد(Sigma) ژلاتینه شده، منتقل و در انکوباتور کشت داده شدند. جهت القاء تمایز سلول ها از غلظت های مختلف DMSO ۰/۱ درصد، ۰/۵ درصد، ۱درصد، ۱/۵ درصد، ۲ درصد استفاده شد. علاوه بر این به برخی چاهک های پلیت باکتریایی هیچ گونه عامل القاء اضافه نشد و به عنوان گروه کنترل(Co group) در نظر گرفته شد(شکل شماره ۱).



شکل شماره ۱. الگوی زمانی تمایز سلول هایP19 به کاردیومیوسیت ها. طی ۲ روز اجسام شبه جنینی شکل گرفته سپس به مدت ۱۸ روز به پلیت چند خانه‌ای که هر یک از چاهک‌های آن حاوی غلظت‌های مختلفDMSO هستند منتقل شدند.

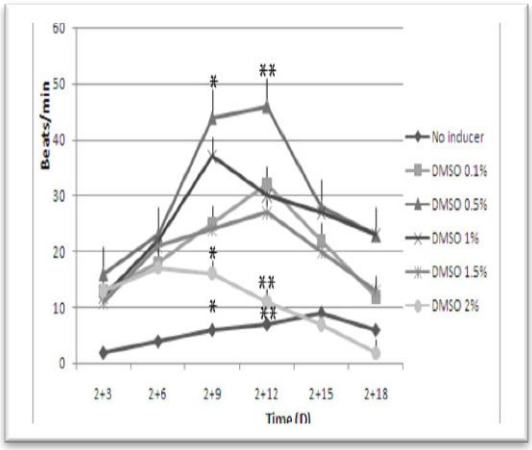
ارزیابی ضربان کاردیومیوسیت های تمایز یافته: پس از شکل گیری اجسام شبه جنینی تعداد ضربان در دقیقه طی روزهای ۳+۲، ۶+۲، ۹+۲، ۱۲+۲، ۱۵+۲ و ۱۸+۲ در گروه های مختلف به وسیله میکروسکوپ معکوس شمارش شدند.

ارزیابی ایمونوسیتوشیمی: در ابتدا کاردیومیوسیت های مشتق شده از سلول های P_{19} در گروه های مختلف توسط PBS سه مرتبه شستشو شدند. سلول‌ها در محلول پارافرمالدئید ۴ درصد یک شب در دمای اتاق تثبیت شدند. با شستشوی مجدد سلول ها با PBS، به مدت ۶۰ دقیقه در دمای اتاق با سرم بز (Goat serum) پوشانده شدند. سپس در محلول H_2O_2 ۳ درصد قرار داده شدند. آنتی‌بادی اولیه F-actin (Dako) با رقت ۱:۴۰۰ به مدت ۴۵ دقیقه به نمونه‌ها افزوده شد. آنتی بادی ثانویه EnVision TM (Dako) به مدت ۳۰ دقیقه به نمونه ها اضافه شد. سلول‌ها توسط میکروسکوپ نوری بررسی شدند. تعداد ضربان کاردیومیوسیت ها در گروه های مختلف با آزمون ANOVAیک طرفه و نرم افزار آماری SPSS ارزیابی شدند ($P<0.05$).

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2023-03-21]

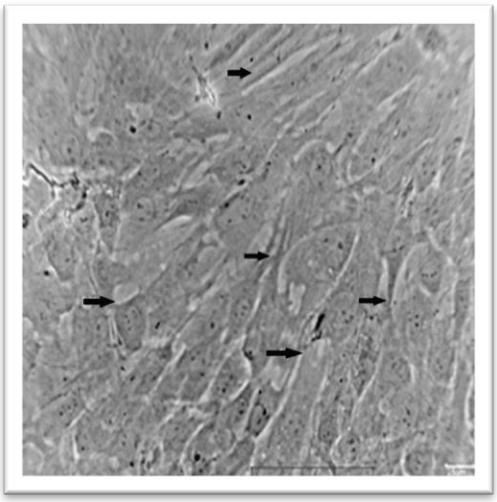
یافته های پژوهش

تمایز سلول‌های P_{19} به کاردیومیوسیت‌ها: تعداد ضربان در دقیقه در تمامی گروه‌ها حتی در گروهی که هیچ گونه عامل القایی را دریافت نکرده بود از روز ۳+۲ مشاهده شد. نتایج نشان داد که تعداد ضربان در کاردیومیوسیت‌های تمایز یافته در غلظت‌های پایینDMSO (۰/۱ درصد و ۰/۵ درصد) نسبت به سایر گروه‌ها بیشتر بود. حداکثر ضربان در روز ۱۲+۲ با میزان ۴۶ ضربان در دقیقه در غلظت DMSO ۰/۵ درصد مشاهده شد و با دوزهایDMSO ۲ درصد و صفر در این روز اختلاف معنی داری دارد ($P<0.05$). اختلاف معنی داری نیز در فرکانس ضربان در روز ۹+۲ با دوز DMSO ۲ درصد و گروه کنترل وجود دارد($P<0.05$)(نمودار ۱).



نمودار شماره ۱. تعداد ضربان در دقیقه در غلظت های مختلف. DMSO (P*<0.05)

تغییرات مورفولوژیکی سلول های تحت تمایز به صورت روزانه به وسیله میکروسکوپ معکوس مورد ارزیابی قرار گرفته اند. یافته ها نشان داد که بیشتر این تغییرات در غلظت های پایین DMSO (۰/۱ درصد و ۰/۵ درصد) بروز پیدا کرد. توجه شود که اولین علائم پیدایش تغییرات مورفولوژیکی در حدود روز ۶+۲ پدیدار گشت. در مقایسه با گروه کنترل سلول‌ها از لحاظ ابعاد طویل‌تر و باریک‌تر بودند. در ادامه تمایز مجموعه ای از توده‌های(Clusters) ۵ الی ۶ سلولی در غلظت‌های پایین DMSO به ویژه در روز ۹+۲ و دوز DMSO ۰/۵ درصد مشاهده شد. نکته مهم، این که سلول‌های تمایز یافته در این کلاسترها به صورت موازی با یکدیگر تجمع یافته‌اند. هم‌چنین افزایش مشخصی در اندازه سیتوپلاسم و زواید سیتوپلاسمی دیده شد و با سلول‌های مجاور ارتباط برقرار کردند. در سیتوپلاسم کاردیومیوسیت‌های تمایز یافته تراکم بالایی از گرانول‌ها وجود داشت و کاردیومیوسیت های موجود در کلاسترها ساختارهای لوله‌ای شکل(Tube-like) و ظاهری مخطط مشابه بافت قلبی ایجاد کردند (شکل شماره ۲). علاوه بر این، نتایج حاصل از ارزیابی ایمونوسیتوشیمی ثابت کرد که کاردیومیوسیت های مشتق شده از P_{19} که تحت تیمار غلظت‌های پایین DMSO قرار گرفته‌اند قادر به بیان پروتئین اختصاصی قلبی F-actin می‌باشند و سلول‌های F اکتین مثبت با ظاهری مشخص و سیتوپلاسم واضح از سلول های F اکتین منفی مشخص هستند(شکل شماره ۳).



شکل شماره ۲. تغییرات مورفولوژیکی حاصله در کاردیومیوسیت‌های مشتق از P_{19}. در غلظت ۰/۵ درصد DMSO سلول‌ها عمدتاً به شکل چندوجهی شده و با سلول‌های مجاور ارتباط تنگاتنگی دارند(فلش‌ها).

شکل شماره ۳. سلول‌های بیان کننده F اکتین در غلظت DMSO ۰/۵ درصد(پیکان ها)، (بزرگ نمایی ۲۰×).

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2023-03-21]

بحث و نتیجه گیری

با توجه به این که تمایز کاردیومیوسیت ها از سلول های سرطانی P_{19} اهمیت ویژه ای در شناخت مکانیسم های دخیل در بیولوژی تکاملی، پیوند سلولی و درمان دارد لذا دانستن شرایط کشت مطلوب این سلول ها جهت القای تمایز به رده سلولی خاص من جمله کاردیومیوسیت ها ضروری می باشد. در مطالعه حاضر با به کار گیری غلظت های مختلف DMSO سعی شده تا ویژگی های کاردیومیوسیت های تمایز یافته معین گردد.

یافته های تحقیق حاضر ثابت می کند که افزودن غلظت های مختلف DMSO به محیط کشت سلول های P_{19} منجر به القاء فرآیند کاردیومیوژنزیس می گردد. نتایج نشان داد که سلول های تمایز یافته از لحاظ مورفولوژیکی مشابه کاردیومیوسیت ها هستند و کاردیومیوسیت های تمایز یافته پروتئین قلبی F اکتین را نیز بیان می کنند. هم چنین نواحی ضربان دار نیز در سلول های تمایز یافته مشاهده شدند. تحقیقات اخیر نشان داد که اعضای ابر خانواده TGF-β از طریق برخی مسیرهای سیگنالی در القاء تمایز کاردیومیوسیت ها و فاکتورهای نسخه برداری قلبی نظیر Nkx2.5 نقش به سزایی دارند. یکی از شناخته شده ترین مسیرهای سیگنالی به Wntβ catenin بر می گردد. در همین ارتباط گزارشاتی وجود دارد مبنی بر این که افزودن ۱ درصد DMSO به همراه Fibroblast Growth Factor 8 (FGF8) به سلول های PC19CL6 در روز اول سبب بیان Wnt3A و Wnt8 می گردد اما در روز چهارم از میزان بیان پروتئین های سیگنالینگ کاسته شده است به نظر می رسد که این فرآیند جهت مراحل بعدی تمایز کاردیومیوسیت ها ضروری باشد(۱۶-۱۴).

افزودن DMSO به محیط کشت سلول های P_{19} منجر به القائ گیرنده های اندوتلین ویژه قلبی (Cardiac-specific endothelin receptors) می گردد. برخی از فاکتورهای نسخه برداری که طی القاء DMSO بیان می گردد شامل Nkx2.5،ATA4 و Myocyte enhancer factor 2C هستند. افزودن DMSO به محیط کشت القایی، سبب افزایش میزان یون کلسیم داخل سلولی می گردد(۱۶،۱۷). یکی از مکانیسم های احتمالی اثر گذاری DMSO از طریق گیرنده اکسی توسین می باشد چرا که DMSO می تواند سبب بیان میزان بالای از گیرنده مذکور گردد. در همین ارتباط McBurney و همکاران اظهار داشتند که تمایز کاردیومیوسیت ها وابسته به دوز می باشد به طوری که غلظت کم DMSO منجر به القاء فرآیند تمایز کاردیومیوسیت ها می شود(۸). در تحقیق حاضر علاوه بر این، جهت تمایز سلول های P_{19} به کاردیومیوسیت ها از غلظت های دیگر DMSO نیز استفاده شد. یافته های به دست آمده نشان داد که کاردیومیوسیت های مشتق شده هر چند که از لحاظ مورفولوژیک همانند سلول های قلبی هستند اما تعداد ضربان در این غلظت ها در مقایسه با سایر گروه ها از فرکانس کمتری برخوردار بود.

در پژوهش حاضر نیز شاید علت بی تاثیر بودن غلظت های بالای DMSO جهت تمایز سلول های قلبی از سلول های P_{19} این باشد که DMSO به تنهایی نمی تواند در القاء فرآیند کاردیوژنیک نقش داشته باشد. بنا بر این به نظر می رسد که این فرآیند نیاز به همکاری برخی از مسیرهای سیگنالی باشد که در اثر افزودن ترکیبات مورد نظر به محیط کشت سلول ها ایجاد می شوند. علاوه بر این گزارشات مشابهی در این زمینه وجود دارد، به طوری که تیمار سلول های کارسینومای جنینی موشی و حتی سلول های بنیادی جنینی در حضور هم زمان اکسی توسین و DMSO روند تمایز قلبی را تحریک و تسهیل می نماید(۲۰-۱۸).

ارزیابی‌های میکروسکوپی نشان داد که اولاً این سلول ها بیشتر به کاردیومیوسیت تمایز پیدا کرده اند تا سلول های عضلانی دیگر ثانیاً بیان F-actin در کاردیومیوسیت ها نشانگر این است که سلول های تمایز یافته واجد یک الگوی اتصال سلولی مشابه کاردیومیوسیت ها می باشند. یکی از ویژگی های بارز کاردیومیوسیت ها، پیدایش ضربان در آن ها است. یافته های به دست آمده نشان داد که میزان انقباض پایه در دامنه ۴۶ ضربان در دقیقه بوده که در روز ۱۲+۲ و در غلظت ۰/۵ درصد DMSO مشاهده گردید. علاوه بر این مشخص شد که تعداد ضربان در این گروه نسبت به سایر گروه ها بیشتر بود که دال بر وجود کانال های کلسیمی نوع L وابسته به ولتاژ(I_{ca}) در کاردیومیوسیت های مشتق شده است. نتایج مشابهی در این زمینه وجود دارد مبنی بر این که در حضور ایزوپرنالین کاردیومیوسیت های ضربان دار مشاهده می شود(۱۹). کاردیومیوسیت های تمایز یافته دارای الگوی انقباضی پیوسته می باشند که به برخی از مولکول های چسبنده نظیر N-cadherin، پروتئین های اتصالات شکافدار مثل کانکسین ۴۳ و یون کلسیم وابسته است(۲۱). یکی از دلایل احتمالی در افزایش بیشتر ضربان در غلظت مذکور به آزاد شدن ناگهانی یون کلسیم از ذخایر داخل سلولی بر می گردد که بدین ترتیب

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2023-03-21]

می تواند در روند کاردیومیوژنریس نقش داشته باشد(۲۲). هر چند تمایز سلول ها P_{19} به کاردیومیوسیت ها به مدت زمان القاء و غلظت بستگی دارد. در همین ارتباط گزارشاتی وجود دارد مبنی بر این که وجود سرم در محیط کشت بر روی تمایز کاردیومیوسیت ها تاثیر می گذارد به طوری که حذف سرم سبب افزایش تعداد نواحی ضربان دار در اجسام شبه جنینی می گردد(۲۲-۱۹). یافته های پژوهش حاضر حاکی از آن است که اولاً غلظت های مختلف DMSO در فرآیند القای کاردیوژنزیس نقش به سزایی دارند به طوری که موثرترین غلظت آن ۰/۵ درصد است که طی ۱۲+۲ حداکثر فرکانس ضربان در دقیقه در سلول های تمایز یافته مشاهده شدند. ثانیاً یکی از مطلوب ترین رده های سلولی جهت تمایز کاردیومیوسیت ها، سلول های کارسینومای P_{19} می باشد.

سپاسگزاری

مقاله مذکور برگرفته از طرح تحقیقاتی مصوب دانشگاه علوم پزشکی مازندران تحت نظارت دکتر مجید ملک زاده شفارودی است. بدین وسیله بر خود لازم می دانیم که از جناب دکتر مصطفی لطیف پور به خاطر کمک های علمی تقدیر و تشکر گردد.

References

1.Smith AG. Embryo derived stem cells of mic and men. Annu Rev Cell Dev Biol 2001;17:435-62.
2.Martin GR. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. Proc Natl Acad Sci1981;78:7634-8.
3.McBurney MW, Rogers BJ. Isolation of male embryonal carcinoma cells and their chromosome replication patterns. Dev Biol 1982; 89:503-8.
4.Jianan W. Human bone marrow derived mesenchymal stem cells transplanted into damaged rabbit heart to improve heart function. J Zhejiang Unive Sci 2005;6: 242-8.
5.Lindner U, Kramer J, Rohwedel J, Schlenke P. Mesenchymal stem or stromal cells toward a better understanding of their biology? Transfus Med Hemother 2010;37:75-83.
6.Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. Nature1981; 292 : 154-6.
7.Wang HS. Mesenchymal stem cells in the Wharton's jelly of the human umbilical cord. Stem Cells 2004; 22: 1330-7.
8.McBurney MW. P19 embryonal carcinoma cells. Int J Dev Biol 1993;37: 135–40.
9.Kurosawa H. Methods for inducing embryoid body formation in vitro differentiation system of embryonic stem cells. J Biosci Bioeng 2007;103:389-98.
10.Finkbeiner S, Frumkin M, Kassner PD. Cell based screening extracting meaning from complex data. Neuron2015;86:160-74.
11. Baharvand H, Matthaei KI. 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 Anim 2004;40:76-81.
12. Heng BC, Haider HK, Sim EK, Cao T, Ng SC. Strategies for directing the differentiation of stem cells into the cardiomyogenic lineage in vitro. Cardiovasc Res 2004;62:34– 42.
13.Vanderheyden MA, Defize LH. Twenty one years of P19 cells what an embryonal carcinoma cell line taught us about cardiomyocyte differentiation. Cardiovasc Res 2003;58:292–302.
14.Balana B, Nicoletti C, Zahanich I, Graf EM, Christ T, Boxberger S, Ravens U. 5-Azacytidine induces changes in electrophysiological properties of human mesenchymal stem cells. Cell Res 2006;16: 949-60.
15.Marvin MJ, Dirocco G, Gardiner A, Bush SM, Lassar AB. Inhibition of wnt activity induces heart formation from

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2023-03-21]

posterior mesoderm. Genes Dev 2001; 15:316-27.
16.Tzahor E, Lassar AB. Wnt signals from the neural tube block ectopic cardiogenesis. Genes Dev 2001; 15: 255-60.
17.Klug MG, Soonpaa MH, Koh GY, Field LJ. Genetically selected cardiomyocytes from differentiating embronic stem cells form stable intracardiac grafts. J Clin Invest 1996; 98:216-7.
18.Segev H, Kenyaginkarsenti D, Fishman B, Gerechtnir S, Ziskind A, Amit M. Molecular analysis of cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells. Dev Growth Differ 2005; 47: 295-306.
19.Xu W, Zhang X, Qian H, Zhu W, Sun X, Hu J, et al. Mesenchymal stem cells from adult human bone marrow differentiate into a cardiomyocyte phenotype in vitro. Expl Biol Med2004; 229:623-31.
20.Cai CL, Liang X, Shi Y, Chu PH, Pfaff SL, Chen J, et al. Identifies a cardiac progenitor population that proliferates prior to differentiation and contributes a majority of cells to the heart. Dev Cell 2003; 5: 877-89.
21.Xu C, Police S, Rao N, Carpenter MK. Characterization and enrichment of cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells. Circ res 2002;91: 501-8.
22.Snir M, Kehat I, Gepstein A, Coleman R, Itskovitz J, Livne E. Assessment of the ultrastructural and proliferative properties of human embryonic stem cell derived cardiomyocytes. Am J Physiol Heart Circ Physiol 2003; 285:2355-63.

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2023-03-21]

The Effect of DMSO in Induction of Differentiation of Cardiomyocytes from Embryonic Carcinoma Cells P19 in Invitro

*MalekzadehShafaroudi M [*1] , Rezaei N[1], Abedian kenari S[2], Setorg R[1], Latifpour M[3], Ghasemihamidabadi H[1]*

(Received: December 27, 2014 Accepted: February 18, 2015)

Abstract

Introduction: In the present study, the ability of P19 embryonic carcinoma cell differentiation to cardiomyocytes in different concentrations of DMSO was evaluated.

Materials & Methods: In order to providing differentiated P19 cells, embryonic-like objects (Embryoid Bodies, EBs) formed during 2 days through hanging drops method. Then EBs induced for 18 days under the different concentrations of DMSO (0.1%, 0.5%, 1%, 1.5% and 2%). The rate of cardiomyocytes beating was counted with three days interval in the various groups by inverse microscope. Immunocytochemistry was used to illustrate expression of F-actin protein.

Findings: Many morphological changes occurred in cardiomyocytes derived from P19 especially in DMSO 0.5% group, so a remarkable increase in the size of the cytoplasm and cytoplasmic processes was observed. The results revealed that the maximum beating frequency per minute was observed in DMSO 0.5% group concentration in 2+12 days (2 days for making emberyonic bodies, and 12 days after differentiation induction). In addition, only cardiomyocytes induced differentiation by DMSO 0.5% concentration expressed F-actin which was not expressed in the other concentrations.

Discussion & Conclusion: The findings of this study suggest that, firstly, the most effective concentration in the process of cardiogenesis induction is 0.5%. Secondly, P19 carcinoma cells are desirable and susceptible to differentiate cardiomyocytes.

Keywords: P19 Cells, Cardiomyocytes, F-actin protein, Embryoid bodies, DMSO.

1.Dept of Anatomy and Cell Biology, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
2.Immunogenetic Reserch Center, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
3. Dept of Anatomy, Faculty of Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
** Correspondin author Email: hatefdr@gmail.com*

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2023-03-21]