

تأثیر DMSO در القای تمایز کاردیومیوسمیت ها از سلول های کارسینومای جنینی ۱۹P در شرایط آزمایشگاهی

مجید ملک زاده شفارودی^۱، نورالله رضایی^۱، سعید عابدیان کناری^۲، رها سترگ^۱، مصطفی لطیف پور^۳، هاتف قاسمی حمیدآبادی^{*}

- (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 پذیرش: ۹۳/۳/۲۰

تاریخ دریافت: ۹۲/۱۲/۱۳

چکیده

مقدمه: در مطالعه حاضر توانایی تمایز سلول های کارسینومای جنینی P₁₉ در غلظت های مختلف DMSO به کاردیومیوسمیت ها مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روش ها: جهت تمایز سلول های P₁₉، اجسام شبه جنینی (Embryoid Bodies, EBs) به روش قطرات آویزان طی ۲ روز تشکیل شدند. سپس EBs به مدت ۱۸ روز تحت القاتات غلظت های مختلف DMSO (۰/۱ درصد، ۱/۵ درصد، ۱/۱۵ 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 ایمونوستیتوژنی استفاده شد.

یافته های پژوهش: تغییرات مورفوЛОژیکی زیادی در کاردیومیوسمیت های مشتق شده از P₁₉ 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 حداقل تعداد ضربان در دقیقه در غلظت ۰/۵ درصد و در روز ۲+۱۲ (۲ روز برای تشکیل اجسام شبه جنینی به علاوه ۱۲ روز پس از القای تمایز) مشاهده شد. علاوه بر این کاردیومیوسمیت 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 کاردیوژنریس غلظت ۰/۵ درصد است. ثانیاً یکی از مطلوب ترین رده های سلولی جهت تمایز کاردیومیوسمیت ها، سلول های کارسینومای P₁₉ می باشد.

واژه های کلیدی: سلول های P₁₉، کاردیومیوسمیت ها، پروتئین F-actin، اجسام شبه جنینی، DMSO

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

Email: hatefdr@gmail.com

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 ماندند، اغلب به واسطه فیبریلاسیون عملکرد طبیعی خود را از دست می دهند. از آن جایی که کاردیومیوسیت های بالغ قادر به بازسازی و ترمیم خود نیستند، میزان مرگ و میر در بیماران MI فوق العاده زیاد است؛ در این شرایط یافتن مخزن سلولی در دسترس از کاردیومیوسیت تمایز 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(۱-۳).

سلول های بنیادی جنبی مشتق از توده سلولی داخلی جنبین در مرحله بلاستوپریست پر توان بوده و می توانند سلول های هر سه لایه زیایی اکتودرم، مژودرم و اندودرم جنبی 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 جنبی در محیط کشت اخلاقی 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).

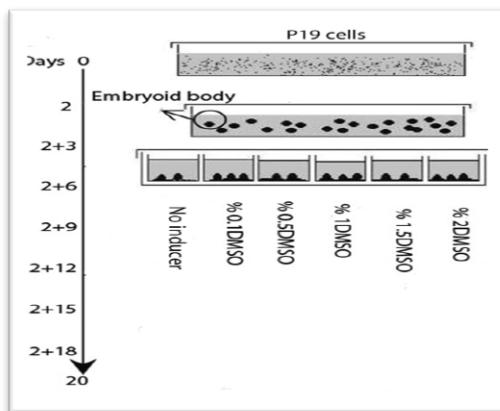
تحقیقات وسیعی بر روی سلول های بنیادی جهت تمایز آن ها به سلول های مختلف و به کارگیری آن ها در درمان بیماری ها به عمل آمده است(۵). برخی از فاکتورها نظیر لایه تغذیه کننده جنبی و فاکتور ممانعت کننده لوکمیایی(LIF) باعث حفظ خاصیت خودبازسازی و پرتوانی در سلول های بنیادی جنبی می شوند به طوری که حذف این فاکتورها از محیط کشت، سلول های بنیادی جنبی شروع به تمایز یافتن به سلول های هر سه لایه زیایی جنبی می نمایند(۳). علی رغم 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 جنبی Embryonic Carcinoma Cells، ECs) گزینه ای مناسب باشد(۶-۸). یکی از انواع سلول های کارسینومای جنبی، P₁₉ می باشد که از تراتو کارسینومای القاء شده در موش تهییه می

شود ولی دارای کاربوبتیپ طبیعی است. در همین ارتباط گزارشات متعددی وجود دارند مبنی بر این که سلول های P₁₉ 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، آنژیوژنر را با ترشح IL6، TNF، CRP تحریک و از مرگ آپوپتیک کاردیومیوسیت 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 چسبینده نظیر N-cadherin، پروتئین های اتصالات شکاف دار مثل کانکسین ۴۳- و یون کلسیم وابسته است. در این میان به نظر می رسد که کاربود 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 کاردیومیوزنیک 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 توسمین، آزو سایتیدین و دی متیل سولفوکساید بهره جست. این دسته از القاء کننده های تمایز سلولی عمدهاً 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 شیمایی القاء کننده بستگی دارد. توانایی تمایز کاردیومیوزنیک 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 سزاگی در القای تمایز کاردیومیوسیت ها از سلول های P₁₉ در شرایط آزمایشگاهی داشته باشد. در این مطالعه، سلول های P₁₉ کشت و تکثیر داده شدند و سپس تحت اثر دی متیل سولفوکساید در مسیر تمایز به سلول های قلبی

انکوباتور کشت داده شدند. جهت القاء تمایز سلول ها از غلظت های مختلف DMSO ۰/۱ درصد، ۰/۵ درصد، 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 های P19 به کاردیومیوسمیت ها. طی ۲ روز اجسام شبه جنینی شکل گرفته سپس به مدت ۱۸ روز به پلیت چند خانه ای که هر یک از چاهک های آن حاوی غلظت های مختلف DMSO هستند منتقل شدند.

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

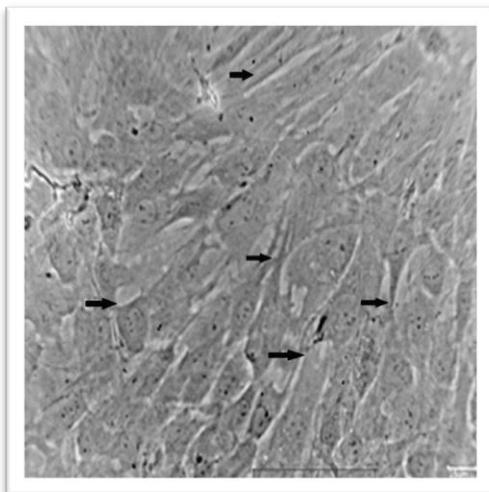
ارزیابی ایمونوپرتوژنیک: در ابتدا کاردیومیوسمیت های مشتق شده از سلول های P19 در گروه های مختلف توسط PBS سه مرتبه شستشو شدند. سلول ها در محلول پارافرمالدئید ۴ درصد یک شب در دمای اتاق ثبیت شدند. با شستشوی مجدد سلول ها با PBS، به مدت ۶۰ دقیقه در دمای اتاق با سرم بز (Goat serum) پوشانده شدند. سپس در محلول H₂O₂ ۳ درصد قرار داده شدند. آنتی بادی اولیه F-actin (Dako) با رقت ۱:۴۰۰ به مدت ۴۵ دقیقه به نمونه ها افزوده شد. آنتی بادی ثانویه EnVision TM (Dako) به مدت ۳۰ دقیقه به نمونه ها اضافه شد. سلول ها توسط میکروسکوپ نوری بررسی شدند. تعداد ضربان کاردیومیوسمیت ها در گروه های مختلف با آزمون ANOVA یک طرفه و نرم افزار آماری SPSS ارزیابی شدند ($P < 0.05$).

قرار گرفتند. پس از تشکیل اجسام شبه جنینی و القاء سلول ها با DMSO به مدت ۱۸ روز، اجسام شبه جنینی به پلیت های سلولی منتقل شده و کلنی های حاصل توسط میکروسکوپ معکوس از نظر تعداد ضربان، مورفوЛОژی 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 کاردیومیوسمیت ها با حداکثر تعداد ضربان مادر و مدام در راستای تشکیل پروتئین میوفیلامنت اتفاقی F-actin در درون سلول های تمایز یافته از اجسام شبه جنینی حاصل از تکثیر سلول های کارسینوماتی جنینی P19 است.

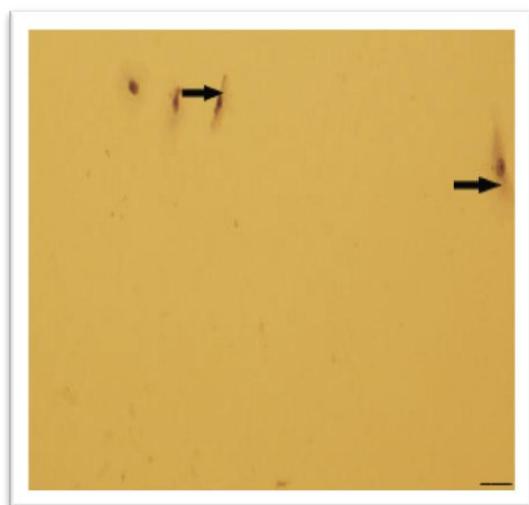
مواد و روش ها

کشت و تکثیر سلول های P19: در این تحقیق از سلول های P19 (خریداری شده از انیستیتو پاستور تهران) استفاده شد. محیط کشت این سلول ها شامل High DMEM-Glucose (Gibco) که حاوی ۱۵ درصد سرمه جنین گاوی (Mm, Gibco)، ۰/۱ Mm مراکپتو 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 CO₂ 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 EBs) شکل گیری اجسام شبه جنینی بر مبنای روش قطرات آویزان (Hanging Drops) انجام شد (۲). بدین ترتیب سوسپانسیونی از سلول های P19 ایجاد شد و با شمارش سلولی، تعداد ۱۰۰۰ سلول در هر قطره ۲۰ میکرومتری (1000 cells/drop) از محیط کشت بر روی درپوش پتی 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 ۱٪ درصد (Sigma) ژلاتینه شده، منتقل و در

سیتوپلاسم کاردیومیوسمیت‌های تمایز یافته تراکم بالایی از گرانول‌ها وجود داشت و کاردیومیوسمیت‌های 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 ایمونوستوشیمی ثابت کرد که کاردیومیوسمیت‌های مشتق شده از P₁₉ که تحت تیمار غلظت‌های پایین DMSO قرار گرفته‌اند قادر به بیان پروتئین اختصاصی قلبی F-actin می‌باشند و سلول‌های F-акتین مثبت با ظاهری مشخص و سیتوپلاسم واضح از سلول‌های F-اكتين منفی مشخص هستند(شکل شماره ۳).



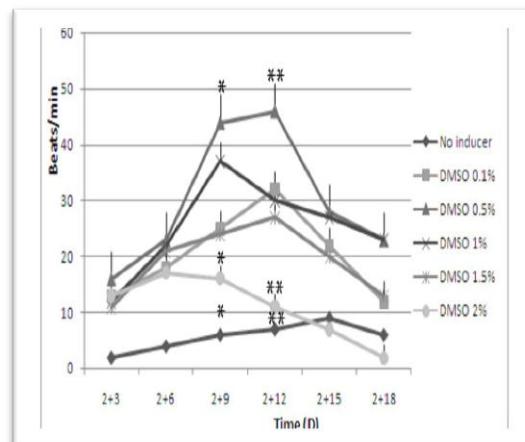
شکل شماره ۲. تغییرات مورفولوژیکی حاصله در کاردیومیوسمیت‌های مشتق از P₁₉ در غلظت ۰/۵ درصد DMSO سلول‌ها عمدتاً به شکل چندوجهی شده و با سلول‌های مجاور ارتباط تنگاتنگی دارند(فلش‌ها).



شکل شماره ۳. سلول‌های بیان کننده F-اكتين در غلظت ۰/۵ درصد(پیکان‌ها)، (بزرگ نمایی $\times 20$).

یافته‌های پژوهش

تمایز سلول‌های P₁₉ به کاردیومیوسمیت‌ها: تعداد ضربان در دقیقه در تمامی گروه‌ها حتی در گروهی که هیچ گونه عامل القایی را دریافت نکرده بود از روز ۲+۳ مشاهده شد. نتایج نشان داد که تعداد ضربان در کاردیومیوسمیت‌های تمایز یافته در غلظت‌های پایین DMSO (۰/۱ درصد و ۰/۵ درصد) نسبت به سایر گروه‌ها بیشتر بود. حداقل ضربان در روز ۲+۱۲ با میزان ۴۶ ضربان در دقیقه در غلظت ۰/۵ درصد مشاهده شد و با دوزهای DMSO ۲ درصد و صفر در این روز اختلاف معنی داری دارد P<0.05. اختلاف معنی داری نیز در فرکانس ضربان در روز ۲+۹ با دوز ۲ درصد و گروه کنترل وجود دارد(P<0.05)(نمودار ۱).



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

تغییرات مورفولوژیکی سلول‌های تحت تمایز به صورت روزانه به وسیله میکروسکوپ معکوس مورد ارزیابی قرار گرفته‌اند. یافته‌ها نشان داد که بیشتر این تغییرات در غلظت‌های پایین DMSO (۰/۱ درصد و ۰/۵ درصد) بروز پیدا کرد. توجه شود که اولین علائم پیدایش تغییرات مورفولوژیکی در حدود روز ۲+۶ پدیدار گشت. در مقایسه با گروه کنترل سلول‌ها از لحاظ ابعاد طویل‌تر و باریک‌تر (Clusters) بودند. در ادامه تمایز مجموعه ای از توده‌های ۵ الی ۶ سلولی در غلظت‌های پایین DMSO به ویژه در روز ۲+۹ و دوز 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

بحث و نتیجه گیری

القاء فرآیند تمایز کاردیومیوسمیت ها می شود(۸). در تحقیق حاضر علاوه بر این، جهت تمایز سلول های P₁₉ به کاردیومیوسمیت ها از غلظت های دیگر DMSO نیز استفاده شد. یافته های به دست آمده نشان داد که کاردیومیوسمیت 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 P₁₉ این باشد که DMSO به تنها یک 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 کارسینوماتی 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(۱۸-۲۰).

ارزیابی های میکروسکوپی نشان داد که اولاً این سلول ها بیشتر به کاردیومیوسمیت تمایز پیدا کرده اند تا سلول های عضلانی دیگر ثانیاً بیان F-actin در کاردیومیوسمیت ها نشانگر این است که سلول های تمایز یافته واجد یک الگوی اتصال سلولی مشابه کاردیومیوسمیت ها می باشند. یکی از ویژگی های بارز کاردیومیوسمیت 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 ۲+۱۲ و در غلظت ۵/۰ 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 کاردیومیوسمیت های مشتق شده است. نتایج مشابهی در این زمینه وجود دارد مبنی بر این که در حضور ایزوپیرنالین کاردیومیوسمیت های ضربان دار مشاهده می شود(۱۹). کاردیومیوسمیت های تمایز یافته دارای الگوی انقباضی پیوسته می باشند که به برخی از مولکول های چسینده 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

با توجه به این که تمایز کاردیومیوسمیت ها از سلول های سلطانی P₁₉ 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 کاردیومیوسمیت ها ضروری می باشد. در مطالعه حاضر با به کار گیری غلظت های تمایز مختلف DMSO سعی شده تا ویژگی های کاردیومیوسمیت های تمایز یافته معین گردد.

یافته های تحقیق حاضر ثابت می کند که افزودن غلظت های مختلف DMSO به محیط کشت سلول های P₁₉ منجر به القاء فرآیند کاردیومیوژنیس می گردد. نتایج نشان داد که سلول های تمایز یافته از لحاظ مورفولوژیکی مشابه کاردیومیوسمیت ها هستند و کاردیومیوسمیت 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 کاردیومیوسمیت ها و فاکتورهای نسخه برداری قلبی نظیر Nkx2.5 نقش به سزاگیری دارند. یکی از شناخته شده ترین مسیرهای سیگنالی به Wnt β catenin بر می گردد. در همین ارتباط گزارشاتی وجود دارد مبنی بر این که افزودن ۱ Fibroblast Growth درصد DMSO به همراه PC19CL6 Factor 8 (FGF8) به سلول های Wnt3A و Wnt8 می گردد اما در روز اول سبب بیان Wnt β catenin چهارم از میزان بیان پروتئین های سیگنالینگ کاسته شده است به نظر می رسد که این فرآیند جهت مراحل بعدی تمایز کاردیومیوسمیت ها ضروری باشد(۱۴-۱۶).

افزودن DMSO به محیط کشت سلول های P₁₉ منجر به القای گیرنده های اندوتلین ویژه قلبی-(Cardiac specific endothelin receptors) فاکتورهای نسخه برداری که طی القاء DMSO بیان می Myocyte Nkx2.5,ATA4 گردد شامل ۲C enhancer factor 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 کاردیومیوسمیت ها وابسته به دوز می باشد به طوری که غلظت کم DMSO منجر به

تمایز یافته مشاهده شدند. ثانیاً یکی از مطلوب ترین رده های سلولی جهت تمایز کاردیومیوسمیت ها، سلول های کارسینومای P₁₉ می باشد.

سپاسگزاری

مقاله مذکور برگرفته از طرح تحقیقاتی مصوب دانشگاه علوم پزشکی مازندران تحت نظرارت 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 تقدير و تشکر گردد.

می تواند در روند کاردیومیوژنریس نقش داشته باشد(۲۲). هر چند تمایز سلول ها P₁₉ به کاردیومیوسمیت 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 کاردیومیوسمیت ها تاثیر می گذارد به طوری که حذف سرم سبب افزایش تعداد نواحی ضربان دار در اجسام شبه جنینی می گردد(۱۹-۲۲). یافته های پژوهش حاضر DMSO حاکی از آن است که اولاً غلظت های مختلف در فرآیند القای کاردیومیوژنریس نقش به سزاگی دارند به طوری که موثرترین غلظت آن ۰/۵ درصد است که طی ۲+۱۲ حداکثر فرکانس ضربان در دقیقه در سلول های

References

- Smith AG. Embryo derived stem cells of mice and men. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2001;17:435-62.
- Martin GR. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci* 1981;78:7634-8.
- McBurney MW, Rogers BJ. Isolation of male embryonal carcinoma cells and their chromosome replication patterns. *Dev Biol* 1982; 89:503-8.
- Jianan W. Human bone marrow derived mesenchymal stem cells transplanted into damaged rabbit heart to improve heart function. *J Zhejiang Univ Sci* 2005;6: 242-8.
- 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.
- Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 1981; 292 : 154-6.
- Wang HS. Mesenchymal stem cells in the Wharton's jelly of the human umbilical cord. *Stem Cells* 2004; 22: 1330-7.
- McBurney MW. P19 embryonal carcinoma cells. *Int J Dev Biol* 1993;37: 135-40.
- Kurosawa H. Methods for inducing embryoid body formation in vitro differentiation system of embryonic stem cells. *J Biosci Bioeng* 2007;103:389-98.
- Finkbeiner S, Frumkin M, Kassner PD. Cell based screening extracting meaning from complex data. *Neuron* 2015;86:160-74.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Marvin MJ, DiRocco G, Gardiner A, Bush SM, Lassar AB. Inhibition of wnt activity induces heart formation from

- 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 embryonic stem cells form stable intracardiac grafts. *J Clin Invest* 1996; 98:216-7.
- 18.Segev H, Kenyaginkarsenti D, Fishman B, Gerechtir 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 Med* 2004; 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.



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

MalekzadehShafaroudi M^{*1}, Rezaei N¹, Abedian kenari S², Setorg R¹, Latifpour M³, Ghasemihamidabadi H¹

(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 embryonic 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 Research 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

* Corresponding author Email: hatefdr@gmail.com