

مقایسه فراساختار تکوین کاردیومیوستیهای مشتق از بنیاخته‌های جنینی موش با کاردیومیوستیهای طبیعی

دکتر حسین پهاروند^{*}، دضیه روحانی^۱، عباس پیریانی^۲، عادله طانی^۳، دکتر محمدحسن حیدری^۴، دکتر احمد حسینی^۵

چکیده

مقدمه: بیولوژی سلولهای بنیادی موضوع بسیاری از مطالعات اخیر می‌باشد. بنیاخته‌های جنینی که از توده سلولی داخلی بلاستوسیست به دست می‌آیند به خاطر توانایی اشان در خودبازسازی و چند ظرفیتی بودن ابزاری قدرتمند در طب پیوند آینده و بیولوژی تکوینی می‌باشند. در این مطالعه فراساختار کاردیومیوستیهای مشتق از بنیاخته‌های جنینی در طی روند تکامل آنها با حالت طبیعی مقایسه گردید.

روش بررسی: این مطالعه از نوع بنیادی - کاربردی است. با تشکیل اجسام شبه جنینی (روز صفر) از بنیاخته‌های جنینی موشی رویان B1 و تمایز خود به خودآنها کاردیومیوستیها تهیه شدند. کاردیومیوستیهای دارای ضربان در روزهای ۶، ۷+۷، ۷+۳، ۷+۱۴ و ۷+۲۱ برداشته شده و جهت مطالعات ایمونوستیشیمی و فراساختاری پردازش شدند. کاردیومیوستیهای جنینی و نوزادی طبیعی از قلب جنین‌های موش نژاد ۱۶/۵ NMRI روزه و نوزاد ۲ و ۸ روزه نیز گرفته شد تا امکان بررسی مقایسه‌ای فراهم گردد.

نتایج: کاردیومیوستیهای ابتدایی دستجات میوفیریلی را به صورت پراکنده و نامنظم با میوفیریلهای کم و بیش موازی نشان دادند و دارای صفحات بینایینی در حال تکامل بودند. به تدریج دستجات میوفیریلی نظم بیشتری یافتد و به صورت سارکومرهای مشخص ظاهر شدند. خطوط تیره Z پررنگک تر، میوفیریلها منظم تر و ارگانلهای داخل سلولی تمایز یافته‌تر شدند. در روز ۷+۱۴ باندهای A و I قابل تشخیص شدند. در روز ۷+۲۱ علاوه بر صفحات بینایینی، باندهای A، I، H، خط M، لوله‌های T و شبکه سارکوبلاسمی نیز در سلولها دیده شد. در کاردیومیوستیهای جنینی و نوزاد دو روزه موشی باند H و خط M قابل تشخیص نبودند. اما در کاردیومیوستیهای نوزاد هشت روزه باند H و خط M مشاهد شد.

نتیجه گیری: مطالعات ایمونوستیشیمی و فراساختاری عضلات قلبی تمایز یافته نشان داد که بنیاخته‌های جنینی قادرند به کاردیومیوستیهای با خواص عملکردی و فراساختاری عضلات قلبی تمایز یابند، و هرچه طول دوره کشت بیشتر می‌شود، کاردیومیوستیها تکوین یافته‌تر می‌شوند.

واژه‌های کلیدی: کاردیومیوستیت، تکوین، فراساختار، سلولهای بنیادی جنینی، موش

مقدمه

مطالعه تکوین کاردیومیوستیهای پستانداران در سطوح مختلف از جمله در سطح فراساختاری به دلیل عدم وجود مدلی مناسب مشکل است. لذا برای حصول چگونگی تکوین کاردیومیوستیهای پستانداران مدل‌های سلولی مختلفی مورد ارزیابی قرار گرفته است. اولین مورد، کشت اولیه

۱- نویسنده مسئول: استادیار گروه پژوهشی سلولهای بنیادی، پژوهشکده روان، تهران، تلفن ۰۲۱-۰۴۸۶۰۴۲۰

Email: Baharvand50@yahoo.com

۲- کارشناس ارشد گروه آناتومی - مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی

۴- کارشناس گروه پژوهشی سلولهای بنیادی، پژوهشکده روان

۵- استادیار گروه آناتومی - مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی

۶- استاد گروه آناتومی و ریس مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی

۹- دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی شهید بهشتی،

تهران

تاریخ دریافت: ۱۵/۱۲/۸۳

تاریخ پذیرش: ۲۷/۱۱/۸۴

وجود می‌آیند^(۱۵،۱۸). به غیر از تمایز خود به خود کاردیومیوستهای از بن یاخته‌های جنینی، تمایز جهت دار آنها با استفاده از فاکتورهای رشد، مواد شیمیایی و یا هم کشتی با سایر سلولها نیز امکان دارد^(۱۹). این سلولها علاوه بر آنکه منبع قابل ملاحظه‌ای را برای انجام پیوند فراهم می‌کنند، ما را در شناخت فرآیندهای اولیه تکوین دوران جنینی نیز یاری می‌دهند.

لذا، این مطالعه به منظور بررسی فراساختار تکوین کاردیومیوستهای مشتق از بن یاخته‌های جنینی موش و مقایسه آنها با تکوین کاردیومیوستهای طبیعی (in-vivo) موشی انجام شد.

روش بررسی

مطالعه حاضر از نوع بنیادی-کاربردی بوده و با بررسی توصیفی نمونه‌ها انجام گرفت.

کشت بن یاخته‌های جنینی

در این مطالعه از بن یاخته‌های جنینی موش "رویان B1" مشتق از موش نژاد 6/ C57BL استفاده شد^(۲۰). سلولهای فوق روی فیربولاستهای جنین موش ۱۲/۵ روزه نژاد NMRI تیمار شده با مایتومایسین C (Sigma 0503) کشت داده شدند. محیط کشت مورد استفاده حاوی موارد ذیل بود:

Knockout Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DEME) (Gibco, 10029-0.18)

15% Fetal Calf Serum (FCS) (Gibco, 161141-079)

0.1mM β -Mercaptoethanol (Sigma, M7522)

2mM Glutamin (Gibco, 25030-149)

0.1mM Nonessential Amino acids (Gibco, 11140-035)

1000iu/ml Leukemia Inhibitory Factor (LIF)

(Chemicon, ESGRO)

تمایز و کشت کاردیومیوستها

نحوه‌ی تمایز کاردیومیوستها قبل ایان شده است^(۲۱)، به طور خلاصه تعداد ۸۰۰ بن یاخته جنینی در هر قطره (۱۲ μ m) از محیط کشت بدون LIF به صورت آویزان (Hanging drop) در درب پتری دیش به مدت ۲ روز کشت داده شد. این عمل به

(Primary culture) کاردیومیوستهای قلب تمایز یافته است^(۱). اما کشت‌های اولیه کاردیومیوستها به دلیل روش‌های جداسازی سلولهای قلب جنینها و حتی در مراحل ابتدایی تر، به دلیل مقدار اندک ماده میوکاردی و سختی حفظ مرحله تکوینی در کشت سلولی، مناسب نیستند. لذا راه حل دیگر ایجاد رده‌های سلولی (Cell lines) نامیرا برای تمایز کاردیومیوستهای اولیه است که در این زمینه رده‌های سلولی نامیرا (مانند H9c2) از قلب جنین رت^(۲)، قلب رتهای بالغ (RCVC)^(۳)، قلب پرندگان^(۴)، موشهای ترانس ژنی با تومورهای میوکاردی^(۵) و کاردیومیوستهای ترانس ژنی تکثیر شونده^(۶) استفاده گردیده است. اما این رده‌های سلولی دارای مشکلاتی در عملکرد، فراساختار و یا در سطح مولکولی هستند. روش جدید در مطالعه کاردیومیوژنر، با استفاده از بن یاخته‌های جنینی (ES) محقق شده است. سلولهای ES از توده سلولی داخلی جنین‌های موش در مرحله بلاستوسیست بدست می‌آیند^(۸،۷). این سلولها در حضور سلولهای تغذیه کننده (فیربولاستهای جنین موش) و فاکتور ممانعت کننده لوکمیایی (LIF) به صورت نامتایز باقی می‌مانند^(۹). سلولهای ES در شرایط in-vivo پس از انتقال به بلاستوسیست قادرند تا بخشی از فرد را بسازند^(۱۰). در شرایط آزمایشگاهی (in-vitro) (نیز می‌توانند به طور خود به خود، انواع مشتقات آکتودرمی، مزو درمی و آندودرمی را بسازند. به طوری که ماهیچه اسکلتی، ماهیچه صاف، سلولهای عصبی، سلولهای گلیال، سلولهای اندوتیال، سلولهای خونی و سلولهای اپیتلیال را ایجاد کنند^(۱۱). سلولهای ES علاوه بر دارا بودن قدرت تمایز، ترکیبات ماتریکس برون سلولی نظری کلازن، لامینین، نیدروژن و فیبرونکتین را نیز تولید می‌کنند^(۱۲،۱۳).

اولین مرحله برای دستیابی به سلولهای تمایز یافته مثل کاردیومیوستها تشکیل تجمعات سلولی از بن یاخته‌های جنینی است. به این تجمعات سلولی اجسام شبه جنینی (Embryoid bodies) می‌گویند، زیرا این مجموعه سلولی ژن‌های نشانگر سه لایه زاینده جنینی را بیان می‌کنند و از طرفی مشتقات سه لایه زاینده جنینی را می‌سازند^(۱۴).

کاردیومیوستها نیز به طور خود به خود از اجسام شبه جنینی به

فلورسنس مورد ارزیابی قرار گرفتند.

میکروسکوپ الکترونی گذاره

کاردیومیوسیتهای تمايز یافته و نیز قلبهای جنینی و نوزادی نرمال توسط گلولتارالدئید ۲/۵ درصد در بافر فسفات ۱/۰ مولار به مدت ۲۴ ساعت و در دمای ۴ درجه سانتی گراد ثبت اولیه شدند. پس از آن با همان بافر به مدت ۳۰ دقیقه و سه بار تعویض شستشو داده شدند. ثبت ثانویه با اسیمیوم تراکسايد ۱٪ در بافر فسفات ۰/۱ مولار و به مدت ۲ ساعت انجام شد و به دنبال آن شستشو با بافر فسفات مجددا به مدت ۳۰ دقیقه و سه بار تعویض انجام شد. مراحل آبگیری در استون با غلظتهاي صعودي ۵، ۷، ۸۰، ۹۰ و ۱۰۰ درصد (II,I) هر يك به مدت ۲۰ دقیقه انجام شد.

آغشتنگی با رزین - استون با نسبتهاي ۱ به ۳ به مدت يك شب، ۱ به ۱ به مدت ۶۸ ساعت و ۳ به ۱ نيز به مدت يك شب و نهايآ رزين خالص به مدت ۸۱۰ ساعت انجام شد. پس از آن نمونهها در رزين خالص قالب گيری شده و در دمای ۶۰ درجه سانتي گراد به مدت ۲۴ ساعت نگهداري شدند تا رزين پليمريزه شده و سفت گردد. پس از پليمريزاسيون بلوکهای رزینی با اولتراميکروتوم (Leica ultracut R) برش داده شدند و برشهای ۵۰-۶۰ نانومتری روی گریدهای ۲۰۰ مش مسی (TAAB: GM 032/CR type HR24) برده شدند. گریدها با يورانيل استات ۵ درصد به مدت ۲۰ دقیقه و سیترات سرب ۰/۵ درصد به مدت ۱۰ دقیقه رنگ آمیزی شدند. سپس گریدها با میکروسکوپ الکترونی گذاره (TEM) مدل Ziess EM900 بررسی و عکسبرداری شدند.

نتایج

تجلي آلفا - اكتينين در طی تکوين کاردیومیوسیتهای مشتق از بن یاختههای جنینی

ایمونوستوشیمی سلولها نشان داد که کاردیومیوسیتهای حاصل به صورت دوکی، گرد و چهار تا چند وجهی هستند و دارای ساختارهای سارکومری سلولهای ماهیچه‌ای می‌باشند. به طوری که سلولها به صورت مخطط جلوه می‌کردند. در ضمن، کاردیومیوسیتها در تمام گروهها نشانگر ماهیچه‌ای آلفا - اكتينين

منظور تشکیل اجسام شبه جنینی (Embryoid bodies) انجام شد. به دنبال آن اجسام شبه جنینی تشکیل شده برای کشت سوسپانسیون به دیش باکتریایی انتقال یافته و به مدت ۵ روز به صورت سوسپانسیون در محیط کشت بن یاخته‌های بدون LIF کشت داده شدند. محیط کشت سلولها یکروز در میان تعویض گردید. در روز ۷ ۵+۲ کشت، اجسام شبه جنینی به پلیت ۲۴ خانه ژلاتینی شده (Sigma G-2500)(0.1w/v) (Sigma G-2500) منتقل شدند و در محیط حاوی DMEM (Gibco, 12800-017) ، استرپتومایسین (Gibco 15140-148) (0.1mM)، بتامر کاتپوتانول (Sigma, M-7522) (0.1mM) اسیدهای آمینه FCS 15٪، (Gibco, 11140-035) (0.1mM) غیر ضروری (Gibco, 11140-035) و بیکربنات سدیم (3.7g) (Gibco, 11140-035) (Gibco, S-5761) به مدت ۲۱ روز کشت داده شدند (۷+۲۱). نواحی حاوی کاردیومیوسیتهای ضرباندار در روزهای ۶، ۷+۳، ۷+۷ و ۷+۱۴ با میکروسکوپ اینورت فاز کتراست مشاهده و جدا شدند.

ایمونوستوشیمی

در روزهای ۵-۱۰، ۷+۷ و ۷+۱۴ نواحی ضرباندار (Olympus, CKX43) در روشنایی میکروسکوپ اینورت فاز کتراست جسم شبه جنینی به روش مکانیکی تحت میکروسکوپ اینورت فاز کتراست جدا شده و پس از شستشو در محلول فسفات بافر (PBS) عاری از Mg^{2+} و Ca^{2+} تریپیسینه شدند. سپس سلولهای جدا شده مجددا کشت شده و بعد از يك تا دو روز برای ایمونوستوشیمی رنگ آمیزی شدند. به طوری که سلولها در ابتدا دوبار با PBS شستشو شدند و بعد با محلول متانول: استون (۳:۱) در ۲۰ درجه سانتی گراد و یا پارافرمالدیید ۴٪ در دمای اتاق ثبت شدند. پس از شستشوی مجدد (دوبار با PBS) سلولها با سرم ۱٪ بز پوشانده شدند (۳۰ دقیقه) سپس آنتی آلفا - اكتينين (Sigma A7811) با غاظت (۱:۸۰) به مدت ۶۰ دقیقه و در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مجموعه‌های سلولی اضافه شد، و مجددا سلولها سه بار با PBS شستشو شده (هر با ۱۰ دقیقه) و به دنبال آن آنتی بادی ثانویه نشاندار با FITC (Sigma F9006) اضافه شد (۱:۱۰۰) و به مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه انکوبه شدند. در پایان سلولها سه بار با PBS شستشو و با میکروسکوپ

بزرگ بوده و دانه‌های ترشحی ANF (Atrial Natriuretic Factor)

در سیتوپلاسم آنها مشاهده می‌شد (شکل ۲A).

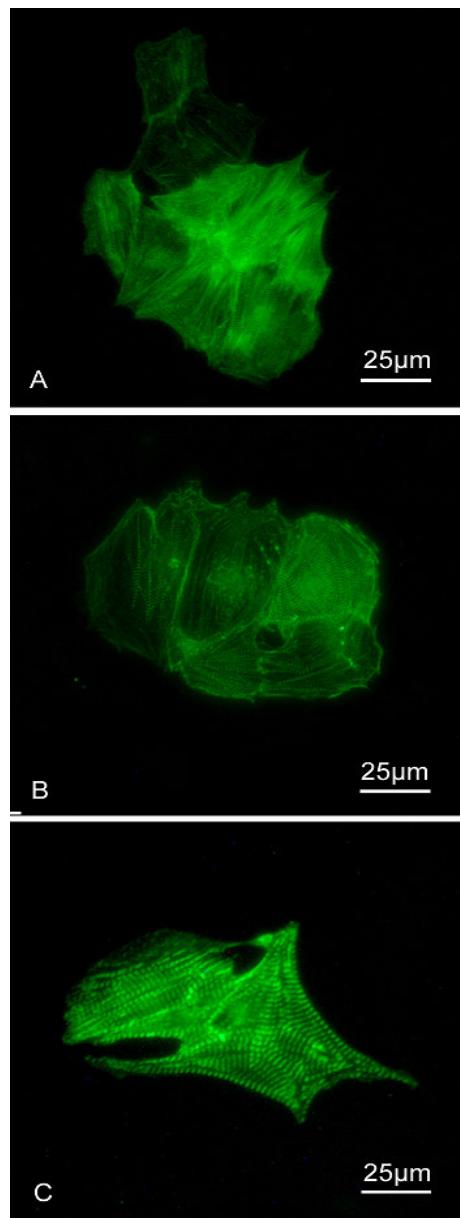
کاردیومیوسیتیهای ۷+۳ روزه

کاردیومیوسیتیهای ۷+۳ روزه دارای هسته‌های بزرگ بوده و اطراف هسته گرانولهای ANF مشاهده می‌شد. در این سلولها دستجات میوفیریلی به صورت پراکنده و نامنظم اما گاه به صورت کم و بیش موازی یکدیگر بودند. میوفیریلها در جهات مختلف آرایش یافته و ضخامت این دستجات در قسمتهاي مختلف سلول متفاوت بود. خطوط تیره Z واقع بر روی میوفیریلها در بعضی نواحي کاملاً تشکیل شده اما در بعضی دیگر در حال شکل گرفتن بود. باندهای A و I هنوز به وضوح مشاهده نمی‌شدند. صفحات بینایینی (Intercalated discs) که شاخص منحصر به فرد سلولهای عضله قلب می‌باشد در حال تکامل بود. در سطح سیتوپلاسم سلول مقادیر زیادی گلیکوژن، ریبوزومهای آزاد و پلی‌زومها گسترش یافته بود. واکونلهای پینوسیتویک نیز در سطح سیتوپلاسم دیده می‌شد. ارگانلهای دیگر سلول مثلاً شبکه اندوبلاسمیک، دستگاه گلژی و میتوکندریها به وضوح مشاهده می‌شدند. در بعضی نواحی سلول مقطع عرضی میوفیریلها نیز به چشم می‌خورد (شکل ۲B).

کاردیومیوسیتیهای ۷+۷ روزه

در این سلولها دستجات میوفیریلی نظام بیشتری یافته و به صورت سارکومرهای مشخص دیده می‌شدند. خطوط تیره Z پررنگتر و قطورتر شده، اما باندهای A و I هنوز قابل تشخیص نبود. میوفیریلها نیز اغلب موازی یکدیگر بود، اما گاهی در جهات مختلف و به شکل زیگزاگ آرایش یافته بودند. میتوکندریها فراوان با کریستالهای لوله‌ای به خوبی مشاهده می‌شد. دانه‌های ریبوزوم آزاد و گلیکوژن در سطح سیتوپلاسم به میزان زیاد یافت می‌شد و پلی‌زومها در بین میوفیریلها قرار گرفته بودند. دستگاه گلژی، شبکه سارکوبلاسمیک، وزیکولهای پینوسیتویک و نیز تعداد محدودی گرانول ترشحی در سطح سیتوپلاسم مشاهده می‌شد. صفحات بینایینی مشخص با اتصالات مختلف شامل دسموزوم، اتصال بینایینی و اتصال سوراخدار مشاهده می‌گردید (شکل ۲C).

که مشخصه خط Z است را بیان می‌کردند (شکل ۱).

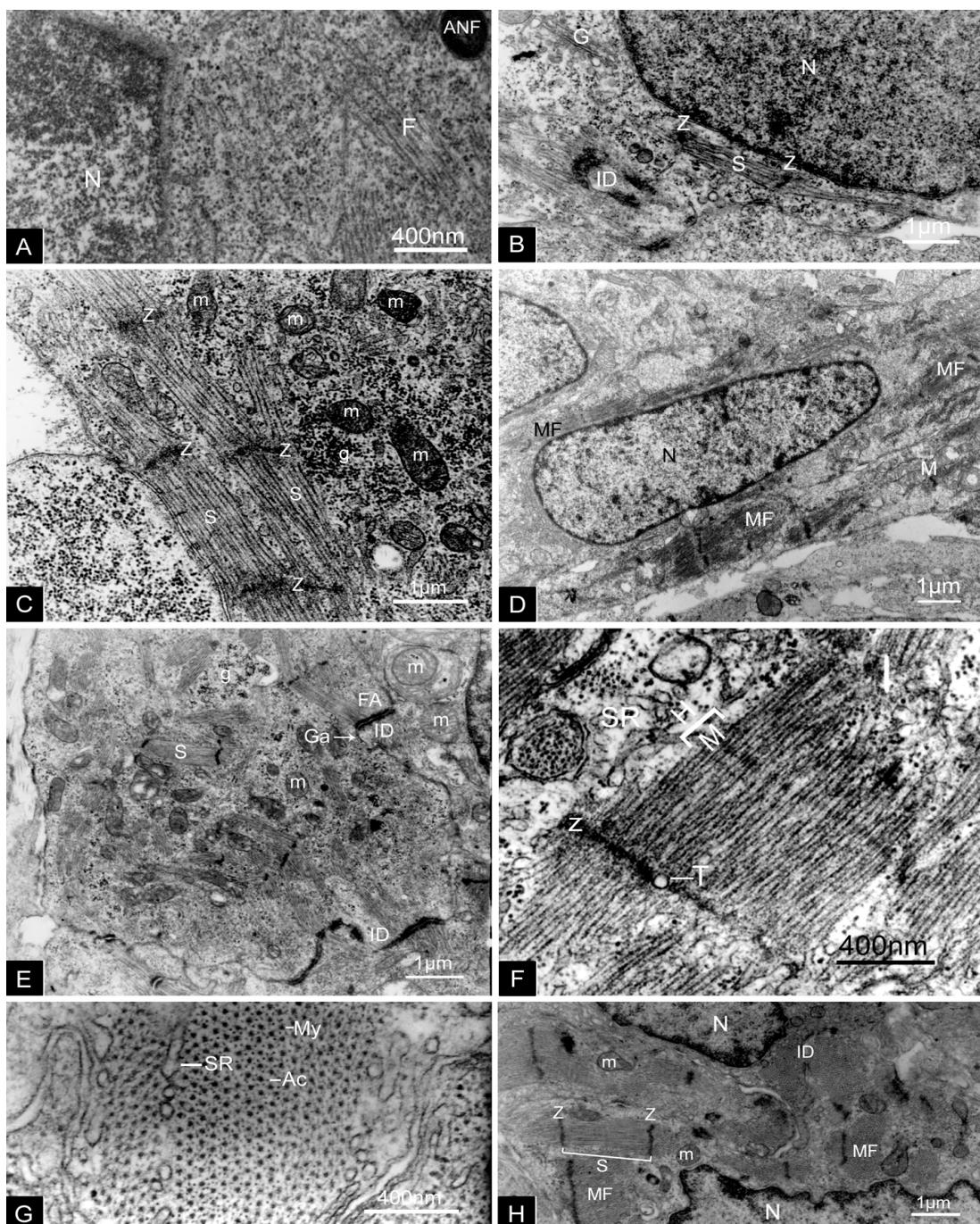


شکل ۱: ایمونوپوشیمی کاردیومیوسیتیهای مشتق از بنیانهای جنینی با استفاده از آنتی‌بادی علیه آلفا-1-کتینین در روزهای (A) ۷+۳، (B) ۷+۷ و (C) ۷+۱۴.

بررسی فرآساختاری کاردیومیوسیتیها

اجسام شبه جنینی ۶ روزه

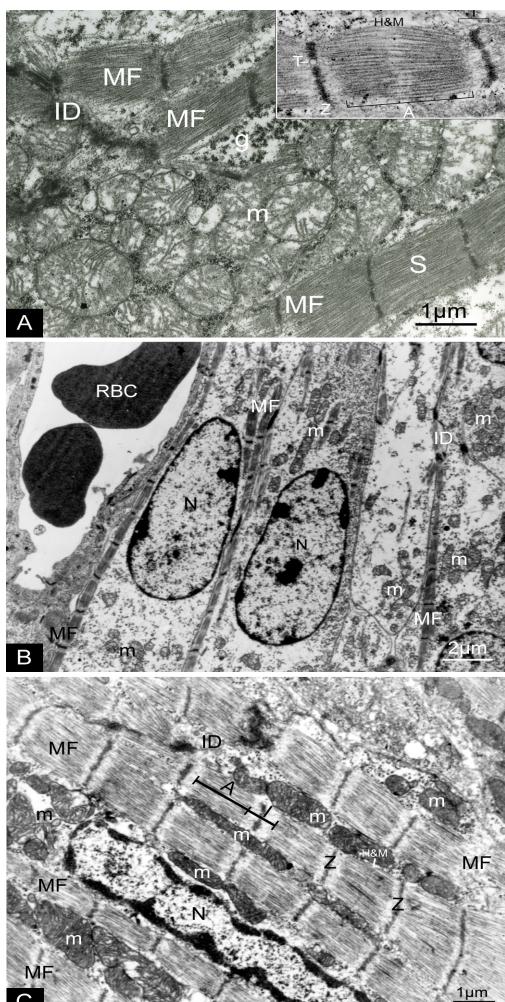
در کاردیومیوسیتیهای اجسام شبه جنینی ۶ روزه میوفیلامانها به صورت تجمعات کوچک یا رشته‌های منفرد در سطح سیتوپلاسم پراکنده بودند. همچنین سلولها دارای هسته‌های



اصطلاحات شکلهاي ۲ و ۳:

A: باند تیره ، AC: اکتین ، ANF: فاکتور ناتریوریک دهلیزی ، C: فیلامان ، G: دستگاه گلزی ، g: گلیکوژن ، H: باند روشن ، ID: صفحات بینایینی ، M: خط M ، m: میتوکندری ، MF: میوفیبریل ، My: میوزین ، N: هسته ، n: هستک ، S: سارکومر ، SR: شبکه سارکوپلاسمیک ، T: لوله عرضی ، Z: صفحه Z

شکل (۲): تصویر میکروسکوپ الکترونی گذاره کاردیومیوسیت‌های جسم شبه جنینی شش روزه (A)، ۷+۳ روزه (B)، ۷+۴ روزه (C)، ۱۴+۱ روزه (D) و ۲۱+۷ روزه (E-H).



* اصطلاحات شکل ۳ همانند شکل (۲) می‌باشد.

شکل (۳): تصویر میکروسکوپ الکترونی گذاره کاردیومیوستیهای جنین ۱۶/۵ روزه (A)، نوزاد دو روزه (B) و نوزاد ۸ هشت روزه (C) می‌فرماید. سارکومرها متشكل از باندهای روشن و تیره (I,A) و خطوط Z بوده، همچنین باندهای H نیز به خوبی قابل تشخیص بود، اما خط M هنوز مشاهده نمی‌شد. لوله‌های T در مقابل خطوط Z قرار داشتند، و پیوندهای سلولی به صورت صفحات بینایینی به وضوح قابل تشخیص بود. تعداد زیادی میتوکندری با کریستالهای لوله‌ای در نواحی مختلف سیتوپلاسم تجمع پیدا کرده بودند. ریبوزومهای آزاد و پلی‌زومها در سیتوپلاسم و در بین میوفیبرهای مشاهده می‌شد. گلیکوژن، گرانولهای ترشحی و

کاردیومیوستیهای ۱۴+۲ روزه

ساختمان سلولی در این سلولها نسبت به گروههای قبلی کاملتر شده بود. به طوری که ارگانلهای داخل سلولی به هم فشرده‌تر و نزدیکتر شده بودند. باندهای A و I در این سلولها قابل تشخیص بود. مقدار میوفیبرهای میتوکندریها بیشتر شده، و گرانولهای ترشحی ANF غشاء دار نزدیک هسته مشاهده می‌شد. صفحات بینایینی بین سلولهای مجاور دیده می‌شد. ارگانلهای سلولی دیگر شامل دستگاه گلزی، رتیکولوم اندوپلاسمیک خشن و ریبوزوم، و همچنین لیپید و گلیکوژن در سطح سیتوپلاسم وجود داشت. در بعضی از سلولها مقاطع طولی و عرضی و گاهی مورب میوفیبرهای با هم مشاهده می‌شدند (شکل ۲D).

کاردیومیوستیهای ۲۱+۲ روزه

در این سلولها میوفیبرهای به صورت سارکومرهای حجیم و نزدیک به هم با محورهای موازی با یکدیگر و باندهای A و I مشخص دیده می‌شدند و بسیاری از آنها برای تشکیل فیبرهای بلندتر به هم متصل شده بودند. خطوط Z قطره‌تر شده و در بعضی از نواحی سیتوپلاسم فضاهای بین میوفیبرهایها توسط ردیفهای میتوکندری پر شده بودند. تمام باندهایی که در یک سلول بالغ قلبی دیده می‌شدحتی باند H و همچنین خط M نیز یافت می‌شد، و لوله‌های T در مقابل خطوط Z قابل تشخیص بود (این محل قرارگیری لوله‌های T منحصر به سلولهای قلبی است). شبکه سارکوپلاسمیک در بین دستجات میوفیبری مشاهده می‌شد. در بخش‌هایی از سلول مقاطع عرضی میوفیبرهای نیز دیده می‌شد که آرایش شش وجهی فیلامنهای اکتین و میوزین آنها قابل توجه بود. صفحات بینایینی با اتصالات مختلف تشکیل دهنده آن به وضوح و فراوان قابل مشاهده بوده، و در سیتوپلاسم مقداری زیادی میتوکندری دستگاه گلزی، ریبوزوم، شبکه اندوپلاسمی، قطرات چربی و گلیکوژن مشاهده گردید (شکل ۲E-H).

جنین ۱۶/۵ روزه موش

کاردیومیوستیهای به دست آمده از قلب جنین ۱۶/۵ روزه نرمال سلولهایی تک هسته‌ای با هسته‌های درشت و روش بودند. در این سلولها ردیفهای سارکومری به صورت

بوده و در آینده نیز خواهد بود. یافته‌های مانشان داد که بن یاخته‌های جنینی موش می‌توانند به طور مؤثری به کاردیومیوستیهای تیپیک و سالم از نظر هیستولوژی تمایز یابند. این نتایج براساس: ۱) توانایی ایجاد ضربان و انقباض این سلولها در محیط کشت ۲) ایمونوستیوشیمی با استفاده از آنتی‌بادیهای علیه پروتئین‌های ماهیچه‌ای^(۳) بررسی فراساختاری این سلولها توسط میکروسکوپ الکترونی گذاره به دست آمد.

در طی بلوغ کاردیومیوستیهای در *in-vitro* ظاهر کلی آنها به صورت کشیده و با میوفیریلهای تکوین یافته تبدیل می‌شد. آلفا - اکتینین در سلولهای بیان کننده آن، به صورت پراکنده در اطراف سیتوپلاسم در مراحل ابتدایی تکامل، تا ساختارهای سارکومری کامل و میوفیریلهای سازمان یافته در سلولهای کشیده، در مراحل پیشرفته تر دیده شدند. بررسی کاردیومیوستیهای تمایز یافته نشان داد که این سلولها عمدتاً تک هسته‌ای و با هسته گرد تا کشیده هستند. این سلولها در جات مختلفی از سازمان‌بندی دستجات میوفیریلی از مرحله ابتدایی تا نهایی را نشان دادند. در ابتدا خطوط Z به صورت نقاطی پراکنده دیده شده و میوفیلامنهای نامنظم و فاقد آرایش خاصی بودند و باندهای A و I مشاهده نشدند. اما با تکوین بیشتر خطوط Z، لوله‌های T و کامل شده، باندهای A، I و H، خط M، لوله‌های T و صفحات بینایینی پدیدار شدند. مطالعات قبلی طی کاردیوژنر در محیط *in-vivo* نیز نشان داده است که میوفیریلهای *in-vivo* در ابتداء پراکنده و نامنظم هستند و به تدریج به آرایش موازی و در نهایت به صورت سارکومری متراتکم در می‌آیند^(۲۵,۲۶). در این مطالعه کاردیومیوستیهای مجاور در جات متفاوتی از سازمان‌بندی میوفیریلی را نشان می‌دادند. همچنین در یک سلول در جات متفاوتی از سرهم‌بندی (Assemble) میوفیریلی و سازمان‌بندی مختلف سارکومری دیده می‌شد. خطوط Z، نوارهای I و A، لوله‌های T و صفحات بینایینی شامل اتصالات بینایینی، اتصالات روزنے دار و دسموزومها در کاردیومیوستیهای مشق از بن یاخته‌های جنینی مشاهده شدند. فاصله بین خطوط Z در روز ۷+۲۱ حدود ۲ μm بود. لوله‌های T، باند H و خط M در بعضی سلولها در روز ۷+۲۱ مشاهده شد. این ساختارها قبلاً

واکوئلهای پینوستیوزی هم در سطح سیتوپلاسم وجود داشت (شکل ۳A).

نوزاد ۲ روزه موش

در کاردیومیوستیهای گرفته شده از قلب نوزاد ۲ روزه نرمال دستجات سارکومری منسجم و قطور مشاهده می‌شد. باندهای روشن و تیره (I, A) و نیز باند H واقع بر باند A دیده می‌شد. اما هنوز نوار M مشاهده نمی‌گردید. میتوکندریهای بزرگ و چسبیده به هم در نزدیکی سارکومرها دیده می‌شدند. تراکم ریبوزومها و پلی‌زومها در سطح سیتوپلاسم کمتر از قبل بوده، و لوله‌های T در مقابل خطوط Z به خوبی مشهود بود. مقطع عرضی میوفیریلها شامل میوفیلامنهای اکتین و میوزین با آرایش شش وجهی نیز دیده می‌شد. صفحات بینایینی به تعداد زیاد بین سلولهای مجاور ارتباط ایجاد کرده‌اند (شکل B).

نوزاد ۸ روزه موش

در کاردیومیوستیهای نوزاد ۸ روزه دستجات سارکومری منظم و بالغ، کاملاً موازی با یکدیگر و در جهت محور طولی سلول جلب توجه می‌کرد. باندهای A و I در همه قسمتها بسیار منظم و شکل مشابه نمونه‌های بالغ به چشم می‌خورد. علاوه بر آن باند H و همچنین خط M هم در بسیاری از قسمتها قابل رویت بود. میتوکندریها بسیار بزرگ بوده و در فواصل سارکومرها به صورت موازی با آنها را دیف شده بودند. سارکوپلاسمیک رتیکولوم گستردگی در سطح سیتوپلاسم مشاهده می‌شد. لوله‌های T درشت بوده و به فراوانی یافت می‌شدند. کپملکسهای صفحات بینایینی به صورت پیچیده تر و در هم فرورفته تر از قبل مشاهده می‌شدند (شکل C).

بحث

تولید کاردیومیوستیهای با ساختار و عملکرد مناسب از بن یاخته‌های جنینی کاربردهای بالقوه بسیاری دارد که از آن جمله درمان میوکارد از طریق پیوند سلولی می‌باشد. چنین کاربردهایی در مدل‌های حیوانی نشان داده شده‌است^(۲۲,۲۴). بیشتر آنچه که ما در مورد تمایز بن یاخته‌های جنینی پرتوان به کاردیومیوست در محیط آزمایشگاه می‌دانیم از مطالعات بن یاخته‌های جنینی موش به دست آمده است. این سلولها موضوع تلاش تحقیقاتی بسیاری

می‌شوند^(۳۴). مقادیر فراوان ریبوزومهای آزاد و پلی‌زومها که به طور گستردۀ در سلول‌های قلبی در حال تکامل یافت می‌شود در کاردیومیوستیهای در حال تمایز در سراسر تکامل در مطالعه حاضر مشاهده شد. این ریبوزومها احتمالاً با فیریلهای درحال تمایز همراه می‌باشند به طوری که هر چه فیلامانها بیشتر شکل می‌گیرند و به فیریلهای تبدیل می‌شوند توزیع ریبوزومها کاهش می‌یابد^(۲۶,۲۷,۳۰). در مطالعه ما این کاهش ریبوزومها در اواخر دوره تمایز قابل تشخیص بود. پدیده مشابه در قلب جنین جوجه نیز گزارش شد^(۲۷). البته قابل ذکر است که تفاوت بین پلی‌زومها و گلیکوژن در میکروگرافهای الکترونی مشکل است. اما در کل با استفاده از رنگ آمیزی‌های مختلف می‌توان گلیکوژن‌ها را که رنگ کمی می‌گیرند از پلی‌زومها که به نسبت رنگ بیشتری می‌گیرند افتراق داد. همچنین گلیکوژن‌ها ععمولاً به صورت دانه‌های بهم چسبیده تجمع می‌کنند در حالی که ریبوزومها میان دیگر ترکیبات سلولی پراکنده‌اند^(۲۸).

در مجموع نتایج این مطالعه نشان داد که بنیاخته‌های جنینی مدل مناسبی برای تکوین کاردیومیوستیهای در محیط آزمایشگاهی هستند و امکان تولید کاردیومیوستیهایی با خصوصیات فرآساختاری بالغ از بنیاخته‌های جنینی موش وجود دارد.

سپاسگزاری

این مطالعه به صورت مشترک بین پژوهشکده رویان و مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی بوده و نگارنده‌گان مقاله بر خود فرض می‌دانند که از همکاری صمیمانه مسئولین هر دو مرکز قدردانی نمایند.

در کاردیومیوستیهای مشتق از بنیاخته‌های جنینی موش گزارش نشده بود. Hescheler و همکاران^(۲۷) و Kehat و همکاران^(۱۶) گزارش کردند که در مقایسه با کاردیومیوستیهای بالغ لوله‌های T، نوار H و خط M در کاردیومیوستیهای مشتق از بنیاخته‌های جنینی موشی و انسانی وجود ندارند. سیستم لوله T و نوار M به عنوان نقطه‌نهایی بلوغ می‌ویریلی هستند و بعد از تولد تکوین می‌یابند^(۲۸,۲۹) و احتمالاً با فشارهای مکانیکی در ضربان قلب مرتبط هستند. حضور این ساختارها در کاردیومیوستیهای مشتق از بنیاخته‌های جنینی، احتمالاً به نژاد موش، کیفیت بنیاخته‌های جنینی، تعداد اولیه بنیاخته‌های جنینی، کیفیت سرم و یا کشت طولانی مدت مربوط می‌گردد. در مطالعه قبلی ما با کشت طولانی مدت کاردیومیوستیهای مشتق از بنیاخته‌های جنینی انسانی، نوار H و لوله T مشاهده شد اما خط M دیده نشد^(۳۰). Snir و همکارانش وجود خط M را در تعدادی از کاردیومیوستیهای مشتق از بنیاخته‌های جنینی انسان، به دنبال شصت روز کشت اجسام شبه جنینی گزارش نمودند، اما لوله‌های T را در هیچ‌کدام از سلولهای مورد نظر نیافرند^(۳۱). لازم به ذکر است که در مطالعات قبلی، کاردیومیوستیهای با تعداد اولیه ۴۰۰ سلول بنیادی جنینی موشی برای تشکیل جسم شبه جنینی ایجاد شدند، اما در اینجا ۸۰۰ سلول بنیادی جنینی به کار برده شد، زیرا در این حالت جواب بهتری با رده سلول بنیادی رویان ۱B اخذ شد^(۲۱). در مطالعه دیگری مشاهده نمودیم که با کشت کاردیومیوستیها بر ماده زمینه برون سلولی اختصاصی (کاردیوژل) مشتق از فیروبلاستهای قلبی، این سلولها زودتر بالغ می‌شوند و در روز ۷+۱۴ لوله‌های T، باند H و خط M در بعضی سلولها دیده

References

- 1- Piper HM, Isenberg G. *Electrophysiology and contractile function*. Boca Raton: CRC Press 1989; vol 2.
- 2- Kimes BW, Brandt BL. *Properties of a clonal muscle cell line from fat heart*. Exp Cell Res 1976; 98: 367-381.
- 3- Jafferdo T, Chestier A, Bachnou N, Dieterlen-Livere F. *MC29 immortalized clonal avian heart cell lines can partially differentiate in vitro*. Exp Cell Res 1991;192: 481-491.
- 4- Caviedes P, Olivares E, Salas K, Cavides R, Jamiovich E. *Calcium fluxes, ioncurrents and*

- dihydropyridine receptors in new immortal cell line from rat heart muscle.* J Mol Cell Cardiol 1993; 25: 829-845.
- 5- Field LJ. *Transgenic mice in cardiovascular research.* Annu Rev Physiol 1993;55: 97-114.
- 6- Sen A, Dunnmon P, Henderson SA, Gerard RD, Chien KP. *Terminally differentiated neonatal rat myocardial cells proliferate and maintain specific differentiated functions following expression of SV40 large T antigen.* J Biol Chem 1988; 19132-19136.
- 7- Eans MJ. *Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells.* Proc Natl Acad Sci USA 1981; 78: 7634-7638.
- 8- Martin GR. *Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells.* Proc Natl Acad Sci USA 1981; 78: 7634-7638.
- 9- Williams RL, Hilton DJ, Pease S, Willson TA, Stewart CL, Gearing DP, Wagner EF, Metcalf D, Nicola NA, Gough NM. *Myeloid leukaemia inhibitory factor maintains the developmental potential of embryonic stem cells.* Nature 1988; 336: 684-684.
- 10- Bradley A, Evans M, Kaufman MH, Robertson E. *Formation of germ-line chimaeras from embryo-derived teratocarcinoma cell line.* Nature 1984; 309: 255-156.
- 11- Smith AG. *Embryo-derived stem cells: of mice and men.* Annu Rev Cell Dev Biol 2001; 17: 435-462.
- 12- Bagutti C, Wobus AM, Faessler R, Watt FM. *Differentiation of embryonal stem cells into keratinocytes: Comparison of wild-type and integrin-deficient cells.* Dev Biol 1996; 179: 184-196.
- 13- Fassler R, Sasaki T, Timpl R, Chu ML, Werner S. *Differential regulation of fibulin, tenascin-c, and nidogen expression during wound healing of normal and glucocorticoid-treated mice.* Exp Cell Res 1996; 222: 111-116.
- 14- Itskovitz-Eldor J, Schuldiner M, Karsenti D, Eden A, Yanuka O, Amit M, Soreg H, Benvenisty N. *Differentiation of human embryonic stem cells into embryoid bodies comprising the three embryonic germ layers.* Mol Med 2000; 6: 88-95.
- 15- Maltsev VA, Wobus AM, Rohwedel J, Bader M, Hescheler J. *Cardiomyocytes differentiated in vitro from embryonic stem cells developmentally express cardiac-specific genes and ionic currents.* Circ Res 1994; 75: 233-244.
- 16- Kehat I, Kenyagin-Karsenti D, Snir M, Segev H, Amit M, Gepstein A, Liven E, Binah O, Itskovitz-Eldor J, Gepstein L. *Human embryonic stem cells can differentiate into myocytes with structural and functional properties of cardiomyocytes.* J Clin Invest 2001; 108: 407-414.
- 17- Wobus AM, Guan K, Yang HT, Boheler KR. *Embryonic stem cells as a model to study cardiac, skeletal muscle, and vascular smooth muscle cell differentiation.* Methods Mol Biol 2002; 185: 127-156.
- 18- XU C, Police Sh, Rao N, Carpenter MK. *Characterization and enrichment of cardiomyocytes derived from human embryonic stem cell.* Circ Res 2002; 91: 501-508.
- 19- Mummery C, Ward-van Oostwaard D, Doevedans P, Spijker R, Van den Brink S, Hassink R, Van der Heyden M, Ophof T, Pera M, De la Riviere AB, Passier R, Tertoolen L. *Differentiation of human embryonic stem cells to cardiomyocytes: role of co-culture with visceral endoderm-like cells.* Circulation 2003; 107:

- 2733-2740.
- 20- Baharvand H, Matthaei KI. *Culture condition difference for establishment of new embryonic stem cells from the C57BL/6 and BALB/c mouse strains.* In Vitro Cell Dev Biol Anim 2004; 40: 76-81.
- 21- بهاروند حسین، آذرنا مهناز، پریور کاظم، کاظمی آشتیانی سعید. خصوصیات کرونوتروپی (ضریابهتی) سلولهای عضله قلبی مشتق از بن یاخته های جنینی. مجله علمی - پژوهشی کوثر، ۱۳۸۳، شماره ۹، صفحات ۲۷۱-۲۶۱.
- 22- Fraidenraich D, Stillwell E, Romero E, Wilkes D, Manova K, Basson CT, Beneszra R. *Rescue of cardiac defects in id knockout embryos by injection of embryonic stem cells.* Science 2004; 306: 247-252.
- 23- Hodgson DM, Behfar A, Zingman LV, Kane GC, Perez-Terzic C, Alekseev AE, Puceat M, Terzic A. *Stable benefit of embryonic stem cell therapy in myocardial infarction.* Am J Physiol 2004; 287: H471-H479.
- 24- Min JY, Yang Y, Converso KL, Liu L, Huang Q, Morgan JP, Xiao YF. *Transplantation of embryonic stem cells improves cardiac function in postinfarcted rats.* J Appl Physiol 2002; 92: 288-296.
- 25- Manasek FJ. *Histogenesis of the embryonic myocardium.* Am J Cardiol 1970; 25: 149-168.
- 26- Chacko KJ. *Observations on the ultrastructure of developing myocardium of rat embryos.* J Morph 1976; 150: 681-709.
- 27- Hescheler J, Fleischmann BK, Lentini S, Maltsev VA, Rohwedel J, Wobus AM, Addick K. *Embryonic stem cells: a model to study structural and functional properties in cardiomyogenesis.* Cardiovasc Res 1997; 36: 149-162.
- 28- Viragh S, Challice CE. *Variations in filamentous and fibrillar organization and associated sarcolemmal structures in cells of the normal mammalian heart.* J Ultrastruct Res 1969; 28: 321-334.
- 29- Forsgren S, Carlsson E, Strehler E, Thomell LE. *Ultrastructural identification of human fetal purkinje fibers: a comparative immunocytochemical and electron microscopic study of composition and structure of myofibrillar M-regions*. J Mol Cell Cardiol 1982; 14:437-449.
- 30- Baharvand H, Kazemi Ashtiani S, Rezazadeh M, Shahverdi A, Taee A, Sabour D: *Establishment and in vitro differentiation of a new embryonic stem cell line from human blastocyst.* Differentiation 2004; 72: 224-229.
- 31- Snir M, Kehat I, Gepstein A, Coleman R, Itskovitz- Eldor J, Livne E, Gepstein L. *Characterization and regulation of T-type Ca²⁺ channels in embryonic stem cell-derived cardiomyocytes.* Am J Physiol Heart Circ Physiol 2003; 285: 2770-2779.
- 32- Baharvand H, Azarnia M, Parivar K, Ashtiani SK. *The effect of extra cellular matrix embryonic stem cell-derived cardiomyocytes.* J Mol cell cardiol 2005; 38: 495-503.