

# عدم تاثیر پلاسمای رت‌های پیش شرطی شده، ایسکمی شده و ایسکمی - خونرسانی مجدد شده میکاردی بر تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی به کاردیومیوسیت

منصور اسماعیلی دهج<sup>۱</sup>، حسن اسمعیلی<sup>۲</sup>، الهام چاوشی نصرآباد\*<sup>۱</sup>، محمدابراهیم رضوانی<sup>۱</sup>، حسین عزیزیان<sup>۱</sup>

## مقاله پژوهشی

**مقدمه:** مطالعات متعدد نشان داده‌اند که پلاسمای غنی شده سبب محافظت سلول‌های میکاردی در برابر ایسکمی می‌شود. در این مطالعه اثر پلاسمای غنی شده رت‌های پیش شرطی شده، ایسکمی شده و خونرسانی مجدد شده میکاردی بر تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان (bone marrow mesenchymal stem cells, BMMSC) به کاردیومیوسیت‌ها مورد ارزیابی قرار گرفت.

**روش بررسی:** در این مطالعه تجربی - آزمایشگاهی BMMSCها از استخوان فمور رت‌های نر بالغ نژاد ویستار با محدوده وزنی ۳۰۰-۲۵۰ گرم استخراج گردید. BMMSCهای پاساژ سوم به شش گروه تقسیم شدند: گروه (۱) کنترل، گروه (۲) آزاسایتیدین، گروه (۳) دریافت‌کننده آزاسایتیدین و پلاسمای غیر ایسکمی، گروه (۴) دریافت‌کننده آزاسایتیدین و پلاسمای پیش شرطی شده، گروه (۵) دریافت‌کننده آزاسایتیدین و پلاسمای ایسکمی شده، گروه (۶) دریافت‌کننده آزاسایتیدین و پلاسمای خونرسانی مجدد شده. در تمام گروه به جز گروه ۱، یک دوز آزاسایتیدین (۱۰ میکرومول) برای یکبار به مدت ۲۴ ساعت اضافه شد تا تمایز به کاردیومیوسیت‌ها را شروع نماید. هر زمان که محیط کشت تعویض می‌شد، پلاسمای (25 µg/ml) نیز به محیط کشت اضافه می‌شد. در نهایت، میزان بیان ژن‌های  $\beta$ MHC، دسمین و تروپونین I میکاردی با استفاده از روش QRT-PCR مورد ارزیابی قرار گرفت.

**نتایج:** بیان ژن‌های  $\beta$ MHC، دسمین و تروپونین I میکاردی در تمام گروه‌های دریافت‌کننده آزاسایتیدین (۲ تا ۶) به طور معناداری افزایش یافت ( $P < 0.01$ ). تفاوت معناداری در بیان ژن‌های  $\beta$ MHC، دسمین و تروپونین I میکاردی و هم‌چنین زمان دابلینگ تایم و مهاجرت بین گروه‌های دریافت‌کننده پلاسمای (۳ تا ۶) با گروه ۲ یعنی آزاسایتیدین به تنهایی وجود نداشت ( $P > 0.05$ ).

**نتیجه‌گیری:** یافته‌ها نشان دادند که پلاسمای جمع‌آوری شده در زمان پیش شرطی شدن ایسکمی، ایسکمی و خونرسانی مجدد تاثیری بر میزان تمایز BMMSCها به کاردیومیوسیت‌ها در حضور آزاسایتیدین ندارد.

**واژه‌های کلیدی:** سلول‌های بنیادی مزانشیمی، پیش شرطی شدن ایسکمی، پلاسمای، دسمین، زنجیره سنگین میوزین - بتا، تروپونین I، آزاسایتیدین

**ارجاع:** اسماعیلی دهج منصور، اسمعیلی حسن، چاوشی نصرآباد الهام، محمدابراهیم رضوانی محمد، عزیزیان حسین. عدم تاثیر پلاسمای رت‌های پیش شرطی شده، ایسکمی شده و ایسکمی - خونرسانی مجدد شده میکاردی بر تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی به کاردیومیوسیت. مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد ۱۴۰۱؛ ۳۰ (۴): ۹۲-۴۷۷۸.

۱- گروه فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید صدوقی یزد، یزد، ایران.

۲- گروه قلب، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم و خدمات بهداشتی درمانی پزشکی گلستان، گرگان، ایران.

\* (نویسنده مسئول): تلفن: ۰۳۵۳۸۲۰۳۴۱۰، پست الکترونیکی: elchavoush@gmail.com، صندوق پستی: ۸۹۱۵۱۷۳۱۴۹

استفاده می‌شود. لذا به منظور افزایش میزان تفکیک MSCها به کاردیومیوسیت‌ها نیاز به تحقیقات بیشتری در آینده می‌باشد. همان‌طور که می‌دانید در زمان ایسکمی و خونرسانی مجدد بافتی یکسری مواد شیمیایی از سلول‌های آسیب دیده آزاد می‌شود که در غلظت‌های بسیار بالا موجب آسیب بافتی می‌شوند و در غلظت‌های کم باعث محافظت بافتی می‌شوند (۱۴). در میان این مواد می‌توان به نیتریک اکساید، آدنوزین و رادیکال‌های آزاد اشاره کرد (۱). در زمان پیش شرطی شدن ایسکمی غلظت‌های کمی از این مواد آزاد می‌شود و سلول‌های هدف را در برابر آسیب شدید بعدی محافظت می‌کنند (۱۵). پیش شرطی شدن ایسکمی پدیده‌های است که با دوره‌های کوتاه و مکرر ایسکمی و خونرسانی مجدد (۱ تا ۵ دقیقه) قبل از ایسکمی خونرسانی مجدد طولانی‌القاء می‌گردد (۱۶). با توجه به توضیحات فوق در این مطالعه در نظر بوده است تا تاثیر پلاسمای تهیه شده از رت‌هایی که ۱ قلبشان پیش شرطی ایسکمی شده، یا ۲ ایسکمی طولانی شده و یا ۳ بعد از ایسکمی طولانی به مدت ۹۰ دقیقه خونرسانی مجدد شده است، بر تمایز MSCهای استخراج شده از مغز استخوان رت‌های نوزاد به کاردیومیوسیت‌ها با آزاسایتیدین مورد ارزیابی قرار گیرد. علت استفاده از MSCهای رت نوزاد این بوده است که تاثیر افزایش سن بر تفکیک و تمایز MSCها در مطالعه حذف گردد. امروز ثابت شده است که با افزایش سن تکثیر و تمایز سلول‌های بنیادی با افزایش سن به تدریج کاهش می‌یابد (۱۷، ۱۸).

### روش بررسی

این مطالعه تحقیقاتی یک کار تجربی - آزمایشگاهی است. به منظور تهیه پلاسمای از ۱۲ رت نر بالغ نژاد ویستار بخش حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد با محدوده وزنی ۲۵۰-۳۰۰ گرم و به منظور استخراج سلول‌های بنیادی مغز استخوان از رت‌های نوزاد ۷ روزه استفاده شد. رت‌ها در دمای  $22 \pm 2$  درجه سانتی‌گراد، رطوبت ۵۵ درصد و سیکل تاریکی-روشنایی ۱۲ ساعته نگهداری شدند. تمام حیوانات دسترسی آزاد به آب و غذا داشتند. تمام پروسیژرهای

با وجود پیشرفت‌های چشمگیر در روش‌های درمانی مبتنی بر خونرسانی مجدد نواحی ایسکمی میوکاردی، از دست رفتن کاردیومیوسیت‌ها به‌ویژه در زمان خونرسانی مجدد یکی از علل اصلی عوارض بعدی بیماری‌های قلبی عروقی است (۱). از این‌رو استفاده از سلول درمانی به‌ویژه استفاده از سلول‌های بنیادی به عنوان یک استراتژی نویدبخش در جایگزینی سلول‌های از دست رفته و بهبود عملکرد سلول‌های باقی مانده مورد توجه خاصی قرار گرفته است (۲، ۳). سلول‌های بنیادی گروهی از سلول‌ها با توانایی تمایز به سایر رده‌های سلولی و پتانسیل خودنوزایی مطرح هستند (۴) که تقریباً در تمام بافت‌های بدن وجود دارند (۵). سلول‌های بنیادی را به روش‌های متعددی تقسیم نموده‌اند (۶). یکی از مهم‌ترین و کاربردی‌ترین دسته سلول‌های بنیادی، سلول‌های بنیادی مزانشیمی (MSC) هستند که تقریباً در تمام بافت‌های بدن مانند استخوان، پانکراس، طحال، روده، قلب و غیره وجود دارند (۷). این سلول‌ها به دلیل خاصیت‌های ایمونومادولاتوری و آنتی‌توموری به عنوان یکی از سالم‌ترین سلول‌ها برای درمان بیماری‌های مختلف از جمله بیماری‌های ایسکمی قلبی در نظر گرفته شده‌اند (۸). اگرچه بیشتر مطالعات بیان می‌دارند که سلول‌های بنیادی تزریق شده به روش‌های متعدد می‌توانند در ناحیه آسیب دیده میوکاردی قرار گیرند و به کاردیومیوسیت‌ها تبدیل شوند، اما تعداد این سلول‌ها بسیار کمتر از آن چیزی است که بتواند جوابگوی نیازهای فیزیولوژی میوکارد باشد (۹). روش‌های متعددی برای تمایز MSCها به کاردیومیوسیت‌ها استفاده شده است شامل استفاده از مواد شیمیایی مانند ۵-آزاسایتیدین (۱۰)، استفاده از عصاره قلبی (۱۱) و هم‌کشتی با کاردیومیوسیت‌ها (۱۲). حداکثر تمایزی کاردیومیوسیتی که تاکنون با استفاده از روش‌های مذکور گزارش شده است در خصوص آزاسایتیدین بوده که حدود ۳۰ درصد بوده است (۱۳). آزاسایتیدین مهارکننده متیلاسیون DNA است که منجر به رونویسی، بیان ژن و تنظیم میوزنیک سلول‌ها می‌گردد. به همین دلیل از آن برای تمایز MSCها به سلول‌های شبه قلبی

جراحی طبق اصول بین المللی نگهداری و مراقبت از حیوانات آزمایشگاهی و تاییدیه کمیته اخلاق دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد انجام شد.

### استخراج و کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان

در مطالعه حاضر از استخوان فمور و تیبیا رت نوزاد که با استفاده از CO<sub>2</sub> بی‌هوش و یوتانازی شدند استفاده گردید. سوسپانسیون آماده شده از طریق فیلتر سل استرینر ۰/۴ میکرومتر فیلتر و سپس با دور ۱۲۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند. سوپرناتانت یا مایع رویی دور ریخته شد و پلت باقی مانده با ۱۰ سی‌سی محیط کشت کامل پیتاژ شد. محلول به دست آمده به پلیت ۱۰ سی‌سی منتقل شد و در انکوباتور با رطوبت ۹۵ درصد، دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، ۵ درصد دی‌اکسیدکربن قرار داده شد. سلول‌های استخراج شده بعد از ۲۴ ساعت در زیر هود لامینار با ۵ سی‌سی PBS (هم‌دما با محیط) دو بار شستشو نموده و سپس محیط کشت کامل (هم‌دما با محیط) به آن اضافه شد. تعویض‌های بعدی محیط کشت هر ۴۸-۷۲ ساعت انجام شد تا زمانی که سلول‌ها به ۸۰ درصد تراکم رسیدند. مایع رویی دور ریخته شد و با ۵ سی‌سی PBS شستشو گردید. سلول‌های بنیادی مزانشیمی چسبیده شده به کف ظرف با تریپسین ۰/۲۵ درصد از کف ظرف جدا شدند. پس از غیر فعال‌سازی تریپسین با محیط کشت، محلول سلولی به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۱۲۰۰ سانتریفیوژ شد. مایع رویی دور ریخته شد و پلت با ۲ سی‌سی محیط کشت کامل پیتاژ شد. بعد از شمارش سلول‌ها، به ازای هر ۱ سانتی متر مربع ظرف کشت ۵۰ هزار سلول اضافه می‌شد و مانند کشت اولیه هر ۴۸ تا ۷۲ ساعت محیط را تعویض گردید تا سلول‌ها به Confluency ۸۰ درصد برسند. این مرحله به عنوان اولین پاساژ سلولی در نظر گرفته شد. برای ادامه مطالعه و تاثیر پلازماها از سلول‌های پاساژ سوم استفاده شده تا یکنواختی بیشتری بین سلول‌ها وجود داشته باشد (۱۹).

### فلوسیتومتری سلول‌های جهت تایید نمودن سلول‌های MSC استخراج شده

برای شناسایی MSCها از حضور مارکرهای CD<sub>44</sub> و CD<sub>90</sub> و عدم حضور CD<sub>45</sub> و CD<sub>34</sub> (مارکرهای سلول‌های بنیادی

هماتوپویتیک) به روش فلوسیتومتری استفاده شد. زمانی که سلول‌های MSC به ۸۰٪ شفافیت رسیدند سلول‌ها تریپسین شده و در لوله ۱۵ml جمع‌آوری شدند. سوسپانسیون به دست آمده در ۲۰۰ g و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ و سلول‌ها جمع‌آوری شدند. سلول‌های مربوطه با استفاده از PBS شست‌وشو شدند. سپس سلول‌ها در بافر رنگ‌آمیزی سلولی (حاوی PBS، سدیم آزید ۰/۵٪، FBS ۲٪) با غلظت‌هایی ۱۰-۵ میلیون سلول در هر ml روی یخ معلق گردیدند. ۱۰۰ μl از سوسپانسیون سلولی در لوله‌های مخصوص ریخته شده و آنتی‌بادی‌های CD<sub>44</sub>، CD<sub>90</sub>، CD<sub>45</sub> و CD<sub>34</sub> به آن‌ها اضافه شد. حال لوله‌های مربوطه به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. سلول‌ها را ۲ بار با PBS شستشو نموده و در ۱۰۰ μl بافر رنگ‌آمیزی سلولی مجدداً معلق شدند. به لوله‌ها streptavidin-phycoerythrin (SA-PE) اضافه شد (۱۵ μg به ازای هر میلیون سلول). محلول در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه در تاریکی انکوبه شد. سلول‌ها در ۴۰۰ μl بافر رنگ‌آمیزی مجدداً معلق و برای فلوسیتومتری به تیوپ فالكون منتقل شدند (۷). تبدیل MSCها به رده استئوژنیک و آدیپوسیت جهت تایید نمودن قدرت تمایز سلول‌های MSC استخراج شده

برای تبدیل MSCها به استئوسیت، پس از اینکه سلول‌ها به Confluency ۸۰ درصد رسیدند، به مدت ۸ هفته در محیط کشت کامل حاوی دگزامتازون (۱۰<sup>-۸</sup> مول)، اسکوربیک اسید ۲-فسفات (۵ μg/ml) و β-گلیسرول فسفات (۱۰ mM) انکوبه شدند. برای مشاهده رسوبات کلسیم، کشت‌ها با PBS شستشو شده و با استفاده از پارافرمالدئید ۴ درصد در PBS به مدت ۳۰-۱۵ دقیقه در درجه حرارت اتاق فیکس و با محلول Alizarin Red (PH: ۴/۲) رنگ‌آمیزی شدند. سپس کریستال‌های کلسیمی در زیر میکروسکوپ مشاهده شدند (۱۰، ۱۹) برای تبدیل MSCها به آدیپوسیت‌ها، MSC به مدت ۸ هفته در محیط کشت حاوی دگزامتازون (۱۰<sup>-۸</sup> M)، انسولین (۲/۵ μg/ml)، ایندومتاسین (۱۰۰ μM) و رزیگلیتازون (۳/۵ μM) انکوبه شدند. در این مرحله آدیپوسیت‌ها به آسانی با استفاده از میکروسکوپ فاز-کانترست از سلول‌های تفکیک نشده قابل شناسایی بودند. اما برای تاییدیه بیشتر ماهیت آن‌ها،

۴. گروه پلاسمای ایسکمی. سلول‌های این گروه پس از این که ۸۰ درصد ظرف کشت را پر نمودند، یک دوز آزاسایتیدین (۱۰ میکرومول) دریافت نمودند. سپس به مدت ۲۸ روز محیط کامل به همراه پلاسمای تهیه شده از رت‌های ایسکمی شده میوکاردی را دریافت نمودند (n=۶).

۵. گروه پلاسمای ری پرفیوژن. سلول‌های این گروه پس از این که ۸۰ درصد ظرف کشت را پر نمودند یک دوز آزاسایتیدین (۱۰ میکرومول) دریافت نمودند. سپس به مدت ۲۸ روز محیط کامل به همراه پلاسمای تهیه شده از رت‌های ایسکمی-خونرسانی مجدد میوکاردی شده را دریافت نمودند (n=۶).

۶. گروه پلاسمای پیش شرطی شده ایسکمی. سلول‌های این گروه پس از این که ۸۰ درصد ظرف کشت را پر نمودند یک دوز آزاسایتیدین (۱۰ میکرومول) دریافت نمودند. سپس به مدت ۲۸ روز محیط کامل به همراه پلاسمای تهیه شده از رت‌های پیش شرطی شده ایسکمی میوکاردی شده را دریافت نمودند (n=۶).

#### تهیه نمونه پلازما

به منظور تهیه پلازما حیوانات با کتامین - زایلازین (به ترتیب ۱۰۰ و ۱۰ میلی‌گرم به ازاء هر کیلوگرم وزن بدن) بی هوش شدند. لید دو الکتروکاردیوگرام با اتصال الکترودهایی به دست راست و پای چپ حیوان ثبت شد. فشار خون‌های شریانی با وارد نمودن کاتولی به داخل شریان کاروتید به‌طور مداوم ثبت شد. سپس به منظور ایجاد ایسکمی و ری پرفیوژن نخ بخیه ۰-۵ پروپیلین از زیر شریان قدامی کرونر چپ عبور داده شد و طبق گروه‌های مورد نظر ایسکمی و ری پرفیوژن ایجاد شد. در گروه‌های سالم ایسکمی ایجاد نشد. در گروه پیش شرطی ایسکمی با ۳ دوره ۵ دقیقه‌ای ایسکمی-خونرسانی مجدد پیش شرطی شدن میوکاردی انجام شد. در گروه ایسکمی فقط ۳۰ دقیقه ایسکمی اتفاق افتاد و در گروه خونرسانی مجدد ۳۰ دقیقه ایسکمی و ۹۰ دقیقه خونرسانی مجدد صورت گرفت. در پایان مراحل مذکور نمونه خون هپارینه از حیوانات جمع‌آوری و پس از سانتریفوژ کردن در دور ۱۲۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه پلازما جمع‌آوری و تا زمان استفاده در یخچال ۸۰- الیکوت و ذخیره شد. میزان پلاسمای استفاده

سلول‌ها با استفاده از فرمالدهید ۴ درصد در PBS به مدت یک ساعت در درجه حرارت اتاق فیکس شدند. سپس با محلول Oil Red O به مدت ۵ دقیقه رنگ آمیزی شدند. پس از یک دقیقه با Harys hematoxiline رنگ آمیزی مخالف شدند. قطرات لیپیدی داخل سلولی به راحتی در زیر میکروسکوپ فاز-کنتراست قابل مشاهده بودند (۱۹، ۱۰).

#### تمایز MSCها توسط ۵-آزاسایتیدین

در این مرحله سلول‌ها از پاساژ سوم انتخاب و بعد از تریپسینه کردن و شمارش، تعداد ۲۵۰۰۰ به ازای هر سانتی‌متر مربع داخل پلیت های ۶ چاهکی کشت داده شدند. ۲۴ ساعت بعد ۵-آزاسایتیدین (۱۰  $\mu$ M، سیگما، آمریکا) طبق گروه‌بندی ذیل به آن‌ها اضافه شد. لازم به ذکر است که در مطالعات مختلف از دوزهای مختلف ۵-آزاسایتیدین برای القا تمایز کاردیومیوژنیکی استفاده شد و از آنجایی که دوز ۱۰ میکرومولار بیشتر مورد استفاده قرار گرفته در این مطالعه از دوز ۱۰ میکرومولار استفاده شد (۲۰). پس از ۲۴ ساعت محیط کشت تعویض شد و دوزهای مد نظر از پلازما طبق گروه‌بندی ذیل به سلول‌ها اضافه شد:

#### گروه‌بندی تجربی

برای انجام این مطالعه سلول‌های پاساژ سوم به شش گروه شش تایی ذیل تقسیم شدند:

۱. گروه کنترل: سلول‌های این گروه پس از این که ۸۰ درصد ظرف کشت را پر نمودند، به مدت ۲۸ روز فقط محیط کامل کشت دریافت نمودند (n=۶).

۲. گروه آزاسایتیدین: سلول‌های این گروه پس از این که ۸۰ درصد ظرف کشت را پر نمودند یک دوز آزاسایتیدین (۱۰ میکرومول) دریافت نمودند، سپس به مدت ۲۸ روز فقط محیط کامل کشت دریافت نمودند (n=۶).

۳. گروه پلاسمای سالم. سلول‌های این گروه پس از این که ۸۰ درصد ظرف کشت را پر نمودند، یک دوز آزاسایتیدین (۱۰ میکرومول) دریافت نمودند. سپس به مدت ۲۸ روز محیط کامل به همراه پلاسمای تهیه شده از رت‌های سالم را دریافت نمودند (n=۶).

نمونه در طول موج‌های ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر و بررسی نسبت آن تعیین گردید. نمونه‌های RNA به فریزر ۸۰- منتقل گردید و یا جهت سنتز cDNA مورد استفاده قرار گرفت. سنتز cDNA توسط کیت مخصوص (پارس طوس- ایران) حاوی پرایمر رندوم هگزامر، نوکلئوتیدهای لازم و آنزیم ترنس کریپتاز معکوس بر روی حجمی معادل ۱۰۰۰ نانوگرم RNA صورت گرفت. نمونه‌های cDNA به فریزر ۲۰- منتقل شدند. نمونه‌ها در حضور پرایمرهای اختصاصی و مسترمیکس حاوی سایبرگرین (یکتا تجهیز - ایران) تحت واکنش Real time PCR قرار گرفتند. ژن بتا-اکتین به‌عنوان رفرنس در نظر گرفته شد. توالی پرایمرها در جدول ۱ نشان داده شده است. بیان ژن‌های هدف به روش  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  تعیین گردید.

#### روش اندازه‌گیری میزان مهاجرت سلول‌ها

برای تعیین زمان مهاجرت سلول‌ها ابتدا تعداد ۱۰۰ هزار سلول به ازاء هر سانتی‌متر مربع در ظرف محیط کشت دانه‌گذاری شد. زمانی که سلول‌ها به تراکم ۸۰ درصد رسیدند، با استفاده از تیغ بیستوری یک خراش در کف ظرف کشت ایجاد شد و نهایتاً پس از ۲۴ ساعت درصد پر شدن ناحیه مذکور را تعیین اندازه‌گیری شد.

شده بر اساس غلظت پروتئین پلازما که با استفاده از روش برادفورد اندازه‌گیری شده بود (DB0017-Catalog Number: 625a، شرکت کالازیست، ایران)، ۲۵ میکروگرم در هر میلی‌لیتر محیط کشت انتخاب شد (۲۱،۲۲). در این مطالعه برای تهیه پلاسمای کافی برای هر گروه (گروه‌های ۳ تا ۶) از ۳ سر رت استفاده شد. پس از اضافه نمودن پلازما به محیط کشت سلول‌ها، محیط کشت‌ها را داخل انکوباتور قرار داده و ۲-۳ روز یکبار با محیط کشت تازه و پلازما طبق گروه‌بندی که در بالا ذکر شد تعویض شدند. گروه‌های سلولی ۲۱ روز پس از کشت اولیه جمع‌آوری شدند. در طی این مدت سلول‌ها از لحاظ شکل، اندازه و حرکت پایش می‌شدند.

بررسی تغییرات سطح mRNA ژن‌های هدف توسط PCR -

#### Real time RT

برای بررسی بیان ژن‌های دسمین،  $\beta$ -MHC و تروپونین I که نشانه‌هایی از سلول‌های کاردیومیوسیت می‌باشند، از روش Real-time PCR استفاده شد. بدین صورت که ابتدا با استفاده از محلول RNXplus (سیناژن- ایران) و مطابق دستورالعمل شرکت سازنده استخراج RNA صورت گرفت. کمیت و کیفیت RNA استخراج شده با قرائت جذب نوری

جدول ۱: توالی پرایمرهای مورد استفاده جهت انجام واکنش Real time RT-PCR

Primer Name	sequence (5'-3')	Product size
Actin Forward $\beta$ -	GTGGATTGGTGGCTCTATC	124
Actin Reverse - $\beta$	GTAACAGTCCGCCTAGAAG	
Desmin Forward	GTCCTACACCTGCGAGATTG	162
Desmin Reverse	CGGGCCATCTCATCCTTTAG	
MHC Forward $\beta$ --	GGGATGATGCAGCGTACAAA	132
MHC Reverse $\beta$ -	AGACAAGGGCAAAGGCAAAG	
Troponin I Forward	TCAAGATGGGAGATGAGGA	135
Troponin I Reverse	AGTTCTGCTTCTCGGATT	

شدند و توسط فرمولی که در زیر آمده است (۲۳) دابلینگ تایم محاسبه شد:

$$DT = t \times \log(2) / (\log NH - \log NI)$$

t = کل زمان از شروع کشت تا اندازه‌گیری نهایی

#### روش اندازه‌گیری دابلینگ تایم

برای تعیین دابلینگ تایم سلول‌ها ابتدا تعداد ۱۰۰ هزار سلول به ازاء هر سانتی‌متر مربع در ظرف محیط کشت دانه‌گذاری شد. بعد از گذشت حدوداً ۲۴ ساعت تعداد سلول‌های دیش شمارش

شستشوی سلول‌ها، از محیط خارج می‌شدند، ۲ سلول‌های چسبان به کف فلاسک که سلول‌های مزانشیمی مغز استخوان خوانده می‌شوند. این سلول‌ها در روزهای اول کشت به تعداد اندک، کوچک و گرد هستند. (شکل ۱A) نمایی از سلول‌های هماتوپوئیک و سلول‌های چسبیده مزانشیمی (فلش) را ۲۴ ساعت بعد از استخراج نشان می‌دهد. با تعویض محیط کشت هر ۲-۳ روز یک بار، سلول‌های خون‌ساز پس از یک هفته به صورت کامل از محیط کشت خارج شدند (شکل ۱B). در این زمان تک لایه‌ای از سلول‌های چسبیده به کف فلاسک دیده می‌شد که به تراکم ۸۰-۷۰ درصدی رسیده بودند (شکل ۱C). سلول‌ها عمدتاً دوکی شکل و شبه فیبروبلاستی بودند و تعدادی سلول گرد، پهن و ستاره‌ای در کف ظرف دیده می‌شد. با انجام اولین پاساژ، سلول‌ها در طی یک هفته به تراکم حداکثری رسیدند و تک لایه‌ای از سلول‌ها با مورفولوژی کشیده دیده شد. در طی پاساژ دوم سلول‌های کشیده شبه فیبروبلاستی افزایش یافتند. در این پاساژ هم سلول‌ها پس از ۴-۵ روز به تراکم حداکثری رسیدند. در پاساژ سوم سلول‌ها از نظر مورفولوژی تقریباً یکنواخت شده بودند و مورفولوژی دوکی شکل داشتند و برای ادامه کار از آن‌ها استفاده شد (شکل ۱C).

NH = تعداد سلول‌های نهایی

NI = تعداد سلول‌های کشت داده شده اولیه در ظرف کشت

### تجزیه و تحلیل آماری

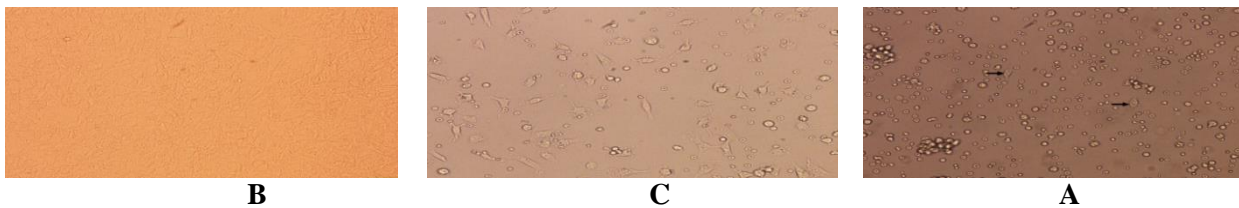
برای انجام این مطالعه از نرم‌افزار گراف پد پریم ۸ استفاده شد. داده‌ها به صورت انحراف معیار  $\pm$  میانگین نشان داده شده است. با توجه به اینکه داده‌ها از توزیع نرمال برخوردار بودند از آنالیز واریانس یک طرفه با پس‌آزمون توکی برای آنالیز داده‌ها استفاده شد. در نهایت  $P < 0.05$  از لحاظ آماری معنادار در نظر گرفته شد.

### ملاحظات اخلاقی

پروپوزال این تحقیق توسط دانشگاه دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد تایید شده است (کد اخلاق IR.SSU.MEDICINE.REC.1400.006).

### نتایج

استخراج و تکثیر سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان سلول‌های استخراج شده از مغز استخوان‌های فمور و تیبیا، پس از کشت در فلاسک مخصوص به دو گروه تقسیم شدند: (۱) سلول‌های هماتوپوئیک یا خون‌ساز که به شکل گرد و شناور دیده می‌شوند که به راحتی با تعویض محیط کشت و



شکل ۱: نمایی از ظاهر و تراکم سلول‌های استخراج شده.

شکل A نمایی از سلول‌ها را بعد از اولین شستشو نشان می‌دهد. فلش‌ها سلول‌های بنیادی مزانشیمی چسبیده به کف ظرف را نشان می‌دهند. شکل B نمایی از ظاهر سلول‌ها را در روز هفتم نشان می‌دهد. شکل C نمایی از سلول‌ها را در پاساژ سوم با تراکم بالای ۸۰ درصد نشان می‌دهد.

شناسایی MSCها با فلوسایتومتری برای انجام فرآیند فلوسایتومتری، سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان پس از پاساژ سوم، به مرکز فلوسایتومتری رها واقع در تهران ارسال شد و نتایج حاصل از آن نشان داد که سلول‌ها نسبت به مارکرهای مزانشیمی CD44 و CD90 مثبت و نسبت به مارکرهای هماتوپوئیک CD34 و CD45 منفی هستند، نمودارهای فلوسایتومتری هر آنتی‌بادی به صورت جداگانه در شکل ۲ نشان داده شده است. بررسی اثر پلاسما استخراج شده از رت‌ها بر تمایز MSCها به آدیپوسیت شکل‌های ۳ نشان می‌دهند که میزان تفکیک سلول‌های بنیادی مزانشیمی به آدیپوسیت‌ها هیچ تفاوت معناداری بین

شناسایی MSCها با فلوسایتومتری

برای انجام فرآیند فلوسایتومتری، سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان پس از پاساژ سوم، به مرکز فلوسایتومتری رها واقع در تهران ارسال شد و نتایج حاصل از آن نشان داد که سلول‌ها نسبت به مارکرهای مزانشیمی CD44 و CD90 مثبت و نسبت به مارکرهای هماتوپوئیک

همانطور که در شکل ۵ نشان داده شده است بر اساس نتایج به دست آمده مشخص شد که آزاسایتیدین بیان ژن‌های  $\beta$ -MHC، *Desmin* و تروپونین I را به‌طور معناداری در مقایسه با گروه کنترل افزایش داده است. اضافه نمودن پلاسمای استخراج شده از رت‌های نرمال یا بدون ایسکمی میوکاردی (Norm)، رت‌های ایسکمی شده میوکاردی (Isc)، رت‌های ایسکمی خون‌رسانی مجدد شده میوکاردی (Rep) و رت‌های پیش شرطی شده ایسکمی میوکاردی (Pre) در غلظت ۲۵ میکروگرم در میلی‌لیتر تاثیری بر بیان این سه ژن در حضور آزاسایتیدین نداشته است. هیچ اختلاف معناداری در بیان ژن‌های  $\beta$ -MHC، *Desmin* و تروپونین I در گروه‌های دریافت‌کننده پلاسماهای مختلف وجود نداشته است.

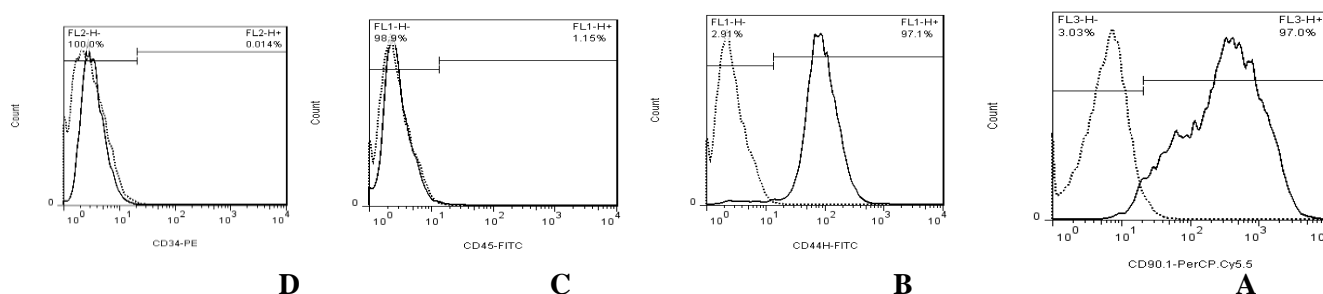
گروه‌های مختلف نسبت به گروه کنترل و حتی بین گروه‌های دیگر وجود نداشته است. نکته قابل‌تامل این است که در مطالعه کنونی این ارزیابی به صورت ظاهری انجام شده است.

بررسی اثر پلاسمای استخراج شده از رت‌ها بر تمایز MSCها به استئوسیت

شکل ۴ نشان می‌دهد که میزان تفکیک سلول‌های بنیادی مزانشیمی به استئوسیت‌ها هیچ تفاوت معناداری بین گروه‌های مختلف نسبت به گروه کنترل و حتی بین گروه‌های دیگر وجود نداشته است. نکته قابل‌تامل این است که در مطالعه کنونی این ارزیابی به صورت ظاهری انجام شده است.

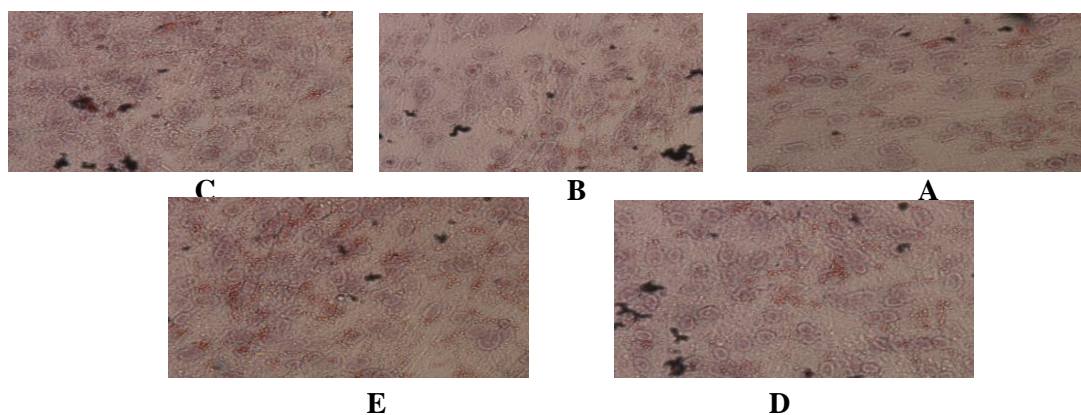
بررسی اثر پلاسمای استخراج شده از رت‌ها بر بیان ژن‌های  $\beta$ -MHC، *Desmin* و تروپونین I در MSCها در حضور ۵-

آزاسایتیدین



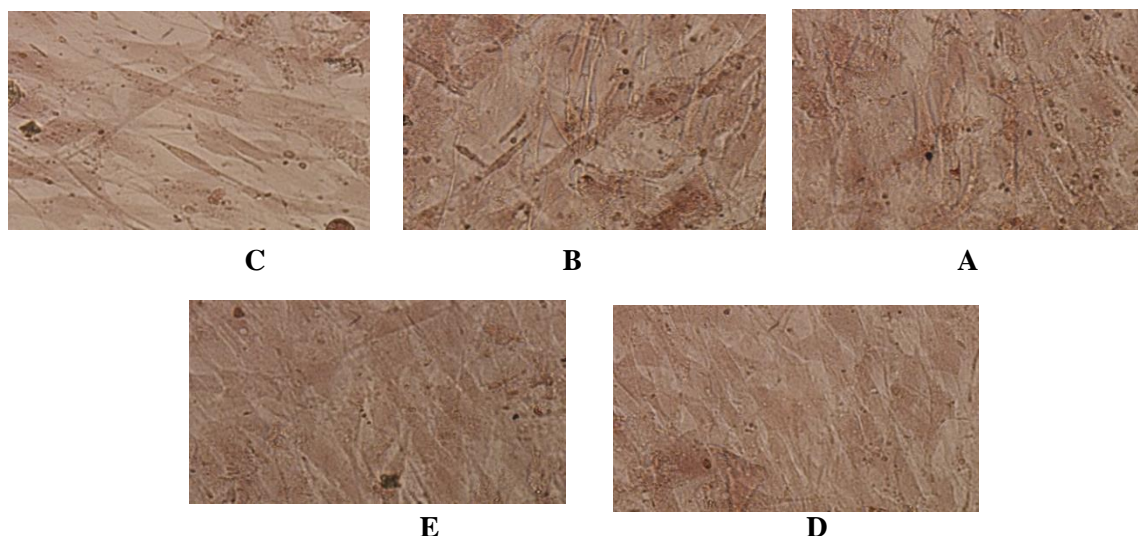
شکل ۲: آنالیز فلوسایتومتری MSC ها.

مارکرهای CD90 و CD44 به عنوان مارکرهای مزانشیمی و مارکرهای CD45 و CD34 به عنوان مارکرهای هماتوپوئیتیک در نظر گرفته شده‌اند.



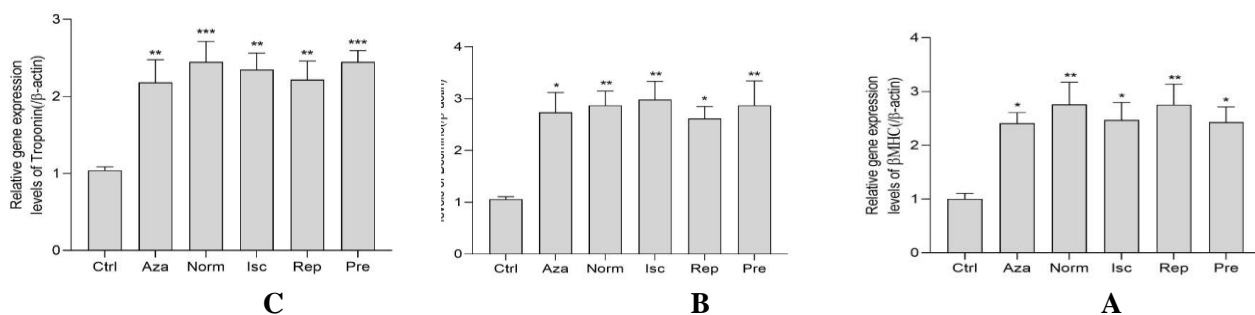
شکل ۳: تاثیر پلاسمای استخراج شده از رت بر تمایز MSC ها به آدیپوسیت.

A، گروه کنترل؛ B، گروه نرمال؛ C، گروه ایسکمی؛ D، گروه ری پرفیوژن؛ E، گروه پیش شرطی.



شکل ۴: تاثیر پلاسمای استخراج شده از رت بر تمایز MSCها به آدیپوسیت.

A، گروه کنترل؛ B، گروه نرمال؛ C، گروه ایسکمی؛ D، گروه خونرسانی مجدد؛ E، گروه پیش شرطی.



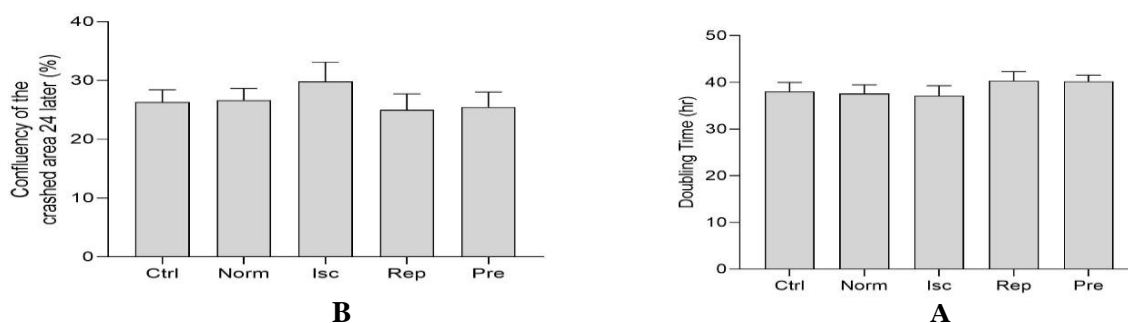
شکل ۵: تاثیر پلاسمای استخراج شده از رت بر تمایز MSCها به کاردیومیوسیتها در حضور ۵-آزاسایتیدین. Ctrl، گروه کنترل؛ Aza، گروه آزاسایتیدین به تنهایی؛ Norm، گروه دریافت کننده پلاسمای رت های بدون ایسکمی؛ Isc، گروه دریافت کننده پلاسمای رت های ایسکمی شده؛ Rep، گروه دریافت کننده پلاسمای رت های ایسکمی - ری پرفیوژن شده؛ Pre، گروه دریافت کننده پلاسمای رت های پیش شرطی شده. داده ها به صورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار نشان داده شده است. \*، \*\* و \*\*\* به معنای اختلاف معنادار نسبت به گروه کنترل است.

در مقایسه با گروه کنترل نداشته است. هم چنین شکل B در نشان می دهد که اضافه نمودن پلاسمای استخراج شده از رت های نرمال یا بدون ایسکمی میوکاردی (Norm)، رت های ایسکمی شده میوکاردی (Isc)، رت های ایسکمی خونرسانی مجدد شده میوکاردی (Rep) و رت های پیش شرطی شده ایسکمی میوکاردی (Pre) در غلظت ۲۵ میکروگرم در میلی لیتر در حضور آزاسایتیدین به MSCها به مدت ۲۸ روز تاثیر معناداری بر مهاجرت آنها در مقایسه با گروه کنترل نداشته است.

بررسی اثر پلاسمای استخراج شده از رت ها بر دابلینگ تایم و

#### مهاجرت MSCها

همانطور که در شکل A نشان داده شده است، اضافه نمودن پلاسمای استخراج شده از رت های نرمال یا بدون ایسکمی میوکاردی (Norm)، رت های ایسکمی شده میوکاردی (Isc)، رت های ایسکمی خونرسانی مجدد شده میوکاردی (Rep) و رت های پیش شرطی شده ایسکمی میوکاردی (Pre) در غلظت ۲۵ میکروگرم در میلی لیتر به MSCها به مدت ۲۸ روز تاثیر معناداری بر میزان دابلینگ تایم آنها نداشته است.



شکل ۶: تاثیر پلاسمای استخراج شده از رت بر دابلینگ تایم و مهاجرت MSCها. Ctrl، گروه کنترل؛ Norm، گروه دریافت کننده پلاسمای رت‌های بدون ایسکمی؛ Isc، گروه دریافت کننده پلاسمای رت‌های ایسکمی شده؛ Rep، گروه دریافت کننده پلاسمای رت‌های ایسکمی - ری پرفیوژن شده؛ Pre، گروه دریافت کننده پلاسمای رت‌های پیش شرطی شده. داده‌ها به صورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار نشان داده شده است.

اشاره کرد. نتایج مطالعه حاضر نشان داد که سلول‌های بنیادی به دست آمده از مغز استخوان با بیان مارکرهای سطحی مزانشیمی CD44 و CD90 و عدم بیان مارکرهای هماتوپوئیتیک CD34 و CD45 ویژگی بنیادی بودن را بروز می‌دهند. نتایج مربوط به بیان این مارکرها مطابق با مطالعات انجام شده توسط سایر محققان است (۱۰،۲۸). مطالعات نشان داده‌اند که سلول‌های بنیادی مزانشیمی تحت شرایط مناسب به انواع رده‌های سلولی مشتق از اکتودرم (سلول عصبی) و مزودرم (غضروف، استخوان، چربی و عضله) تمایز می‌یابند (۳،۲۹). در مطالعه کنونی نیز ظهور ندول‌های استخوانی (در سلول‌های القاشده توسط محیط تمایز به استئوسیت) و همچنین آشکار شدن واکوئل‌های چربی (در سلول‌های تیمار شده در محیط تمایز به آدیپوسیت) به ترتیب با رنگ‌آمیزی آلیزارین رد و اوایل رد او، گواه بر تمایز سلول‌های مزانشیمی به استئوسیت و آدیپوسیت است. بنابراین چندتوانی این سلول‌ها مورد تایید قرار گرفت. سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان در بیشتر زمان‌ها در حالت غیرفعال قرار دارند و هنگامی که در معرض یک محرک (ایسکمی‌ها، مواد شیمیایی، کم‌خونی) قرار بگیرند می‌توانند مهاجرت نموده و به سلول‌های بافت‌های هدف تمایز پیدا کنند (۳۰،۱۰،۱۹). ۵-آزاسایتیدین مهارکننده متیلاسیون DNA است که منجر به رونویسی، بیان ژن و تنظیم میوزنیک سلول‌ها می‌گردد. به همین دلیل از آن برای تمایز MSCها به سلول‌های شبه قلبی استفاده می‌شود (۱۰،۲۱). نتایج مطالعه کنونی نشان داد ۵-آزاسایتیدین با دوز  $10 \mu\text{M}$  به طور

## بحث

نتایج مطالعه کنونی نشان داد که سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان رت هنگامی که در مواجهه با محیط حاوی ۵-آزاسایتیدین قرار می‌گیرند به سلول‌های شبه کاردیومیوسیتی تبدیل شده و ژن‌های  $\beta$ -MHC، *Desmin* و تروپونین I را بیان می‌نمایند. اضافه نمودن پلاسمای استخراج شده از رت‌های نرمال یا بدون ایسکمی میوکاردی (Norm)، رت‌های ایسکمی شده میوکاردی (Isc)، رت‌های ایسکمی خونرسانی مجدد شده میوکاردی (Rep) و رت‌های پیش شرطی شده ایسکمی میوکاردی (Pre) هیچ تاثیری بر بیان این ژن‌ها در حضور ۵-آزاسایتیدین نداشته است. پیشرفت‌های اخیر در زمینه سلول‌های بنیادی موجب درک بهتر از چگونگی تمایز این سلول‌ها و همچنین گشودن افق‌های تازه‌ای در زمینه سلول درمانی گشته است (۲۴). از شایع‌ترین بیماری‌های قلبی می‌توان به انفارکتوس میوکاردی اشاره کرد که منجر به مرگ سلولی غیرقابل برگشت در بخشی از عضله قلبی می‌شود و درصد بالایی از مرگ و میر را در سطح جهان به خود اختصاص داده است (۲۵،۲۶). مهندسی بافت با جایگزین کردن کاردیومیوسیت‌های متمایز شده از سلول‌های بنیادی در بافت آسیب دیده یا از بین رفته، امید تازه‌ای را در بیماران مبتلا یا مستعد به انفارکتوس میوکاردی زنده کرده است (۲۷،۲۳،۲۴). از جمله سلول‌های بنیادی که کاربرد زیادی در تمایز به سلول‌های قلبی را دارند می‌توان به سلول بنیادی مزانشیمی مغز استخوان

wnt و 2-BMP در محیط کشت منجر به تقویت اثر آزاسایتیدین می‌گردد (۱۲،۱۰). استفاده از پلاسمای سلولی که در مقابل محرکی مثل ایسکمی قرار گرفته است منجر به اثرات محافظتی بر روی سلول‌های مختلف بافتی شده است (۳۳). فاکتورهای رشد مختلف از قبیل پروتئین مورفوژنیک استخوانی (BMP-2)، فاکتور رشد تبدیل کننده  $\beta$  (TGF- $\beta$ )، ایتروپوتین (EPO) و فاکتور رشد فیبروبلاستی (FGF) تمایز کاردیومیوژنیک سلول‌های بنیادی را در شرایط آزمایشگاه تسریع می‌بخشد و اثر پیش برنده بر بیان مارکرهای اختصاصی قلبی از قبیل *troponin I*، *MESP 1*، *CAA*، *MEF2c* دارند (۳۴،۳۵). Nilgün Gedik و همکاران اثر واسطه‌های بالقوه هومورال آزاد شده در جریان پیش شرطی شدن ایسکمی در بیمارانی که تحت عمل جراحی بای پس قلبی قرار گرفته‌اند را مورد بررسی قرار دادند و غلظت فاکتورهایی از قبیل پرولاکتین، *troponin I*، *Interleukin-1 $\alpha$* ، *GDF-11*، *Interleukin-8*، *surviving*، *pentraxin-3* و *GH* را قبل و بعد از پیش شرطی شدن ایسکمی مورد اندازه‌گیری قرار دادند، نتایج این مطالعه نشان داد که پلاسمای پیش شرطی شده ایسکمی با فعال کردن مسیرهای سیگنالینگ داخل سلولی و فعالیت فاکتور رونویسی *STAT* در بطن چپ از طریق *interleukin-1 $\alpha$*  اثرات محافظتی خود را اعمال می‌کند (۳۶). Koji Ueno و همکاران گزارش کردند که به دنبال جراحی قفسه سینه در موش‌ها و کاهش جریان خون نخاع، ایسکمی طناب نخاعی (SCI) اتفاق می‌افتد و باعث فلج اندام تحتانی موش می‌شود. اما بستن آئورت شکمی به منظور ایجاد پیش شرطی شدن ایسکمی از راه دور (RIPC) در آن‌ها قبل از جراحی، موجب کاهش شدت آسیب ناشی از ایسکمی می‌شود. همچنین بررسی همزمان فاکتور رشد اندوتلیال عروقی پلاسمای (VEGF) ۲۴ ساعت پس از RIPC، افزایش معنی‌داری داری را در سطح VEGF پلاسمای ایجاد کرد که با بررسی‌های میکرو RNA مشخص شد که این اثر با کاهش تنظیم *miRNA-762* و *miR-3072-5p* همراه است و در نتیجه با افزایش سطح VEGF پلاسمای محافظت در برابر ایسکمی عضو حاصل می‌شود

معنی‌داری بیان مارکرهای قلبی از جمله  $\beta$ -MHC، *Desmin* و تروپونین I را در سلول‌های بنیادی مزانشیمی رت افزایش می‌دهد. طبق آنالیزهای آماری انجام شده بیان این ژن‌ها در گروه Aza افزایش معناداری داشته است. در همین راستا، اثرات کاردیومیوژنیک ۵- آزاسایتیدین در مطالعات دیگری نیز مورد بررسی قرار گرفته است. Makino و همکاران در سال ۱۹۹۹ برای اولین بار نشان دادند که سلول‌های بنیادی مزانشیمی موش‌ها هنگامی که به مدت ۲۴ ساعت در مواجهه با ۵-آزاسایتیدین قرار داده می‌شوند ساختار شبه میوسیتی به خود می‌گیرند و بعد از دو هفته ضربان خود به خودی در آن‌ها مشاهده می‌گردد. تجزیه و تحلیل ایزوفرم ژن‌های پروتئین‌های انقباضی از جمله زنجیره سنگین میوزین، زنجیره سبک میوزین و  $\alpha$ -اکتینین نشان داد که فنوتیپ کاردیومیوسیت‌ها مشابه با کاردیومیوسیت‌های بطنی جنینی می‌باشد. به علاوه، این سلول‌ها قبل از تیمار شدن با ۵-آزاسایتیدین *Nkx2.5/Csx*، *GTAT-4*، *TEF-1* و *MEF-2C mRNA* و بعد از مواجهه با ۵-آزاسایتیدین *MEF-2A* و *MEF-2D* را بیان نمودند (۳۱). Rangappa و همکاران در سال ۲۰۱۴ اثر دوزهای مختلف ۵-آزاسایتیدین (۱، ۳، ۶، ۹، ۱۲ میکرومول در لیتر) را در مدت زمان‌های مختلف تیمار (۲۴، ۴۸، ۷۲ ساعت) بر روی سلول‌های مزانشیمی مشتق از بافت چربی آزمایش کرده و گزارش کرده‌اند حدود ۳۰ درصد از سلول‌ها فنوتیپ کاردیومیوسیتی به خود گرفته‌اند (۲۰). Fukuda نیز در تحقیقات خود، پس از تیمار سلول‌های مغزاستخوان موش با  $3\mu\text{M}$  آزاسایتیدین در بیش از ۳۰ درصد سلول‌ها بیان مارکرهای قلبی را مشاهده کرد (۱۳). در مقابل Yu liu در تحقیقات خود اثر دوزهای مختلف آزاسایتیدین (۵ و ۱۰ میکرومول در لیتر) را روی سلول‌های مزانشیمی مغزاستخوان رت مورد مطالعه قرار داد. نتایج رنگ‌آمیزی آنتی‌بادی و تکنیک وسترن بلات حاکی از عدم بیان مارکرهای ویژه قلبی مثل *Connexin43* و *MHC* بود و در هیچ کدام از گروه‌ها مورفولوژی کاردیومیوسیتی مشاهده نشد (۳۲). علاوه بر ۵-آزاسایتیدین، افزودن فاکتورهایی مانند آنژیوتانسین II، 11-

هم‌چنین پیشنهاد می‌گردد که غلظت‌های بیشتری از پلازماها نیز در مطالعات بعدی استفاده گردد. هم‌چنین توصیه می‌شود که اثرات پلازماهای مورد نظر با سایر عوامل تبدیل‌کننده سلول‌های بنیادی به کاردیومیوسیت‌ها از جمله هم‌کشتی با سلول‌های قلبی و استفاده از عصاره‌های بافت قلبی نیز مورد ارزیابی قرار گیرد. در نهایت در این مطالعه پلازماهای استفاده شده تأثیری بر میزان دابلینگ تیم و مهاجرت MSCها در شرایط آزمایشگاه نداشته است. امروزه ثابت شده است که با افزایش سن در بدن موجودات (۱۷،۱۸) و با افزایش تعداد پاساژها در محیط آزمایشگاه (۴۲) قدرت تکثیر و تمایز سلول‌های بنیادی کاهش می‌یابد. از این‌رو در این مطالعه این متغیرها نیز بررسی شدند که در شرایط مطالعه کنونی تأثیری مشاهده نشد و نیاز است که طبق توضیحات قبلی در تحقیقات آینده مورد توجه بیشتری قرار گیرد.

### نتیجه‌گیری

بر اساس یافته‌های این مطالعه می‌توان نتیجه کرد که مواجه نمودن MSCهای مغز استخوان رت نوزاد به مدت ۲۸ روز به پلازماهای رت‌های بالغی که دچار ایسکمی میوکاردی به تنهای، یا ایسکمی - خونرسانی مجدد میوکاردی و یا پیش‌شرطی شدن ایسکمی میوکاردی شده‌اند، تأثیر معناداری بر تمایز آن‌ها به کاردیومیوسیت‌ها در حضور آزاسایتیدین ندارد. هم‌چنین تأثیر معناداری بر رشد و تکثیر آن‌ها نیز نداشته ندارد.

### سپاس‌گزاری

این مقاله حاصل پایان‌نامه کارشناسی ارشد رشته فیزیولوژی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات درمانی شهید صدوقی یزد به شماره ۱۰۳۷۰ می‌باشد. بدین‌وسیله از کلیه همکاران گروه فیزیولوژی این دانشکده که در انجام این پایان‌نامه ما را یاری نمودند تشکر و قدردانی می‌نماییم.

**حامی مالی:** دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد  
**تعارض در منافع:** وجود ندارد.

(۳۷). در مطالعه‌ای گزارش شد که میزان بیان ژن miR-24 در آگزوزوم‌های حاصل از پلازماهای رت‌های تحت RIPC بسیار بیشتر از آگزوزوم‌های حاصل از پلازماهای رت‌های گروه کنترل است و این اثر با انتقال miR-24 به روش پاراکرین به سلول‌ها منتقل می‌شود و آپوپتوز را کاهش می‌دهد. miR-24 در آگزوزوم‌ها، نقشی اساسی را در واسطه‌گری تأثیرات محافظتی RIPC ایفا می‌کند. این اثرات محافظتی به صورت کاهش آپوپتوز سلول‌های قلب، کاهش اندازه انفارکت و بهبود عملکرد قلب نشان داده شد (۳۸). در مطالعات دیگر نیز مشخص شد RIPC یک روش عملی و غیر تهاجمی برای حفاظت از قلب است به طوری که پلازماهای گرفته شده در فاز آخر RIPC در موش‌های صحرایی و تزریق ۱ تا ۲۴ ساعت قبل از ایسکمی - خونرسانی مجدد در گروه دیگر از طریق ورید دمی و سپس رنگ‌آمیزی منطقه ایسکمی توسط Evans blue و triphenyltetrazolium chloride به وضوح اثرات محافظتی قلبی را نشان داد که قابل انتقال از طریق پلازما است (۳۹). لذا با توجه به توضیحات بیان شده در این مطالعه در نظر بوده است تا بررسی شود آیا پلازماهای رت‌هایی که در معرض زمان‌های مختلف ایسکمی و ری‌پرفیوژن قرار گرفته است تأثیری بر تمایز سلول بنیادی مزانشیمی رت‌ها دارد یا خیر؟ با توجه به مطالعات قبلی در مطالعه کنونی میزان پلازماهای مورد نظر به نحوی انتخاب شد که غلظت پروتئین پلازما در محیط کشت ۲۵ میکروگرم در میلی‌لیتر باشد (۴۰). یافته‌های مطالعه جاری نشان می‌دهد که آزاسایتیدین با دوز ۱۰ میکروگرم توانسته است MSCها را به کاردیومیوسیت تبدیل نماید که با اکثر یافته‌های قبلی هم‌خوانی دارد (۱۰،۴۱). اما اضافه نمودن پلازماهای زمان‌های مختلف ایسکمی و ری‌پرفیوژن نتوانسته‌اند اثری بر تبدیل MSCها به کاردیومیوسیت‌ها و حتی به استئوسیت‌ها و ادیپوسیت‌ها در شرایط آزمایشگاه اعمال نمایند. از این‌رو پیشنهاد می‌گردد که مطالعات بیشتری در خصوص ترکیبات موجود در پلازماها و میزان ترکیبات و نهایت غلظت آن‌ها در محیط کشت‌ها مورد ارزیابی بیشتر قرار گیرد.

## References:

- 1-Cheng B, Zhong JP, Wu FX, Li GL, Ruan QX, Luo G, et al. *Ebselen Protects Rat Hearts Against Myocardial Ischemia-Reperfusion Injury*. *Exp Ther Med* 2019; 17(2): 1412-9.
- 2-Barile L, Lionetti V, Cervio E, Matteucci M, Gherghiceanu M, Popescu LM, et al. *Extracellular Vesicles from human Cardiac Progenitor Cells Inhibit Cardiomyocyte Apoptosis a/nd Improve Cardiac Function Aftermyocardial Infarction*. *Cardiovasc Res* 2014; 103(4): 530-41.
- 3-Labovsky V, Hofer EL, Feldman L, Vallone VF, Rivello HG, Bayes-Genis A, et al. *Cardiomyogenic Differentiation of Human Bone Marrow Mesenchymal Cells: Role of Cardiac Extract from Neonatal Rat Cardiomyocytes*. *Differentiation* 2010; 79(2): 93-101.
- 4-Madonna R, Van Laake LW, Davidson SM, Engel FB, Hausenloy DJ, Lecour S, et al. *Position Paper of the European Society of Cardiology Working Group Cellular Biology of the Heart: Cell-Based Therapies for Myocardial Repair and Regeneration in Ischemic Heart Disease and Heart Failure*. *Eur Heart J* 2016; 37(23): 1789-98.
- 5-Kobolak J, Dinnyes A, Memic A, Khademhosseini A, Mobasheri A. *Mesenchymal Stem Cells: Identification, Phenotypic Characterization, Biological Properties and Potential for Regenerative Medicine through Biomaterial Micro-Engineering of their Niche*. *Methods* 2016; 99: 62-8.
- 6-Porrello ER, Mahmoud AI, Simpson E, Johnson BA, Grinsfelder D, Canseco D, et al. *Regulation of Neonatal and Adult Mammalian Heart Regeneration by the Mir-15 Family*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013; 110(1): 187-92.
- 7-Da Silva Meirelles L, Chagastelles PC, Nardi NB. *Mesenchymal Stem Cells Reside in Virtually All Post-Natal Organs and Tissues*. *J Cell Sci* 2006; 119(11): 2204-13.
- 8-Liras A. *Future Research and Therapeutic Applications of Human Stem Cells: General, Regulatory, and Bioethical Aspects*. *J Transl Med* 2010; 8: 1-15.
- 9-Karantalis V, Suncion-Loescher VY, Bagno L, Golpanian S, Wolf A, Sanina C, et al. *Synergistic Effects of Combined Cell Therapy for Chronic Ischemic Cardiomyopathy*. *J Am Coll Cardiol* 2015; 66(18): 1990-9.
- 10- Hou J, Lü AL, Liu BW, Xing YJ, Da J, Hou ZL, et al. *Combination of BMP-2 and 5-AZA is Advantageous in Rat Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells Differentiation Into Cardiomyocytes*. *Cell Biol Int* 2013; 37(12): 1291-9.
- 11- Massion PB, Dessy C, Desjardins F, Pelat M, Havaux X, Belge C, et al. *Cardiomyocyte-Restricted Overexpression of Endothelial Nitric Oxide Synthase (NOS3) Attenuates B-Adrenergic Stimulation and Reinforces Vagal Inhibition of Cardiac Contraction*. *Circulation* 2004; 110(17): 2666-72.
- 12- Zhang Z, Li H, Ma Z, Feng J, Gao P, Dong H, et al. *Efficient Cardiomyogenic Differentiation of Bone Marrow Mesenchymal Stromal Cells by Combination of Wnt11 and Bone Morphogenetic Protein 2*. *Exp Biol Med* 2012; 237(7): 768-76.

- 13-Fukuda K. *Development of Regenerative Cardiomyocytes from Mesenchymal Stem Cells for Cardiovascular Tissue Engineering*. *Artif Organs* 2001; 25(3): 187-93.
- 14-Barzegar M, Kaur G, Gavins FNE, Wang Y, Boyer CJ, Alexander JS. *Potential Therapeutic Roles of Stem Cells in Ischemia-Reperfusion Injury*. *Stem Cell Res* 2019; 37: 101421.
- 15-Goyal A, Agrawal N. *Ischemic Preconditioning: Interruption of Various Disorders*. *J Saudi Hear Assoc* 2017; 29(2): 116-27.
- 16-Ayodele M, Koch S. *Ischemic Preconditioning in the Intensive Care Unit*. *Curr Treat Options Neurol* 2017; 19(6): 24.
- 17-Asumda FZ, Chase PB. *Age-Related Changes in Rat Bone-Marrow Mesenchymal Stem Cell Plasticity*. *BMC Cell Biol* 2011; 12: 44.
- 18-Beane OS, Fonseca VC, Cooper LL, Koren G, Darling EM. *Impact of Aging on the Regenerative Properties of Bone Marrow-, Muscle-, and Adipose-Derived Mesenchymal Stem/Stromal Cells*. *Plos One* 2014; 9(12): e115963.
- 19-Xing Y, Lv A, Wang L, Yan X. *The Combination of Angiotensin II and 5-Azacytidine Promotes Cardiomyocyte Differentiation of Rat Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells*. *Mol Cell Biochem* 2012; 360(1-2): 279-87.
- 20-Rangappa S, Fen C, Lee EH, Bongso A, Wei ES. *Transformation of Adult Mesenchymal Stem Cells Isolated from the Fatty Tissue Into Cardiomyocytes*. *Ann Thorac Surg* 2003; 75(3): 775-9.
- 21-Pham TLB, Nguyen TT, Van Bui A, Nguyen MT, Van Pham P. *Fetal Heart Extract Facilitates the Differentiation of Human Umbilical Cord Blood-Derived Mesenchymal Stem Cells into Heart Muscle Precursor Cells*. *Cytotechnology* 2016; 68(4): 645-58.
- 22-Gaustad KG, Boquest AC, Anderson BE, Gerdes AM, Collas P. *Differentiation of Human Adipose Tissue Stem Cells Using Extracts of Rat Cardiomyocytes*. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 314(2): 420-7.
- 23-Horwitz EM, Dominici M. *How Do Mesenchymal Stromal Cells Exert their Therapeutic Benefit?* *Cytotherapy* 2008; 10(8): 771-4.
- 24-Keller G. *Embryonic Stem Cell Differentiation: Emergence of a New Era in Biology and Medicine*. *Genes Dev* 2005; 19(10): 1129-55.
- 25-White IA, Sanina C, Balkan W, Hare JM. *Mesenchymal Stem Cells in Cardiology*. *Inmesenchymal Stem Cells* 2016 ; 1416: 55-87.
- 26-Shim WSN, Jiang S, Wong P, Tan J, Chua YL, Seng Tan Y, et al. *Ex Vivo Differentiation of Human Adult Bone Marrow Stem Cells into Cardiomyocyte-Like Cells*. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 324(2): 481-8.
- 27-Lye KL, Nordin N, Vidyadaran S, Thilakavathy K. *Mesenchymal Stem Cells: from Stem Cells to Sarcomas*. *Cell Biol Int* 2016; 40(6): 610-8.
- 28-Zhang L, Chan C. *Isolation and Enrichment of Rat Mesenchymal Stem Cells (MSCs) and Separation of Single-Colony Derived Mscs*. *J Vis Exp* 2010; 37: 2-5.
- 29-Connell JP, Augustini E, Moise KJ, Johnson A, Jacot JG. *Formation of Functional Gap Junctions in Amniotic Fluid-Derived Stem Cells Induced by Transmembrane Co-Culture with Neonatal Rat Cardiomyocytes*. *J Cell Mol Med* 2013; 17(6): 774-81.

- 30-Martin-Rendon E, Sweeney D, Lu F, Girdlestone J, Navarrete C, Watt SM. *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 Sang 2008; 95(2): 137-48.
- 31-Makino S, Fukuda K, Miyoshi S, Konishi F, Kodama H, Pan J, et al. *Cardiomyocytes Can Be Generated from Marrow Stromal Cells in Vitro*. J Clin Invest 1999; 103(5): 697-705.
- 32-Liu Y, Song J, Liu W, Wan Y, Chen X, Hu C. *Growth and Differentiation of Rat Bone Marrow Stromal Cells: Does 5-Azacytidine Trigger their Cardiomyogenic Differentiation?* Cardiovasc Res 2003; 58(2): 460-8.
- 33-Weber NC, Riedemann I, Smit KF, Zitta K, Van De Vondervoort D, Zuurbier CJ, et al. *Plasma From Human Volunteers Subjected to Remote Ischemic Preconditioning Protects Human Endothelial Cells from Hypoxia-Induced Cell Damage*. Basic Res Cardiol 2015; 110(2): 17.
- 34-Bartunek J, Croissant JD, Wijns W, Gofflot S, De Lavarelle A, Vanderheyden M, et al. *Pretreatment of Adult Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells with Cardiomyogenic Growth Factors and Repair of the Chronically Infarcted Myocardium*. Am J Physiol Heart Circ Physiol 2007; 292(2): 1095-104.
- 35-Selvaggi TA, Walker RE, Fleisher TA. *Development of Antibodies to Fetal Calf Serum with Arthus-Like Reactions in Human Immunodeficiency Virus-Infected Patients Given Syngeneic Lymphocyte Infusions*. Blood 1997; 89(3): 776-9.
- 36-Gedik N, Kottenberg E, Thielmann M, Frey UH, Jakob H, Peters J, et al. *Potential Humoral Mediators of Remote Ischemic Preconditioning in Patients Undergoing Surgical Coronary Revascularization*. Sci Rep 2017; 7(1): 12660.
- 37-Ueno K, Samura M, Nakamura T, Tanaka Y, Takeuchi Y, Kawamura D, et al. *Increased Plasma VEGF Levels Following Ischemic Preconditioning are Associated with Downregulation of Mirna-762 and Mir-3072-5p*. Sci Rep 2016; 6(1): 36758.
- 38-Minghua W, Zhijian G, Chahua H, Qiang L, Minxuan X, Weifang Z, et al. *Plasma Exosomes Induced by Remote Ischaemic Preconditioning Attenuate Myocardial Ischaemia/Reperfusion Injury by Transferring Mir-24*. Cell Death & Disease 2018; 9; 1-14.
- 39-Zhao Y, Zheng ZN, Cheung CW, Zuo ZY, Jin SQ. *Transfusion of Plasma Collected at Late Phase after Preconditioning Reduces Myocardial Infarct Size Induced by Ischemia-Reperfusion in Rats in Vivo*. Chin Med J (Engl) 2017; 130(3): 303-8.
- 40-Sarmento B, Andrade F, Da Silva SB, Rodrigues F, Das Neves J, Ferreira D. *Cell-Based in Vitro Models for Predicting Drug Permeability*. Expert Opin Drug Metab Toxicol 2012; 8(5): 607-21.
- 41-Shi S, Wu X, Wang X, Hao W, Miao H, Zhen L, et al. *Differentiation of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells to Cardiomyocyte-Like Cells is Regulated by the Combined Low Dose Treatment of Transforming Growth Factor- B 1 and 5-Azacytidine*. Stem Cells Int 2016; 2016; 3816256.
- 42-Schultz MB, Sinclair DA. *When Stem Cells Grow Old: Phenotypes and Mechanisms of Stem Cell Aging*. Development 2016; 143(1): 3-14.

## Lack of effect of plasma of myocardial preconditioned, ischemic and ischemic-reperfused rats of myocardium on differentiation of mesenchymal stem cells into cardiomyocytes

Mansour Esmailidehaj<sup>1</sup>, Hassan Esmaeili<sup>2</sup>, Elham Chavoushi<sup>\*1</sup>,  
Mohammad Ebrahim Rezvani<sup>1</sup>, Hossein Azizian<sup>1</sup>

### Original Article

**Introduction:** Numerous studies have shown that enriched plasma protects myocardial cells against ischemia. The aim of this study was to evaluate the effect of rat enriched plasma by preconditioning, ischemia, and reperfusion on the differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells (BMMSC) into cardiomyocytes.

**Methods:** In this experimental and laboratory study, BMMSCs were extracted from the femur bone of male Wistar rats weighting 250-300 g. BMMSCs of the third passage were divided into six groups according to the type of plasma received: 1) control, 2) azacytidine, 3) azacytidine and non-ischemic plasma recipient, 4) azacytidine and preconditioned plasma recipient, 5) azacytidine and ischemic plasma recipient 6) azacytidine and plasma reperfusion recipient groups. In all groups except group 1, to initiate cardiomyocyte differentiation, BMMSCs were exposed to azacytidine (10  $\mu$ M) for 24 hours. Plasma (25  $\mu$ g / ml) was added to the culture medium each time the culture medium was changed. After 21 days, the expression level of myocardial  $\beta$ MHC, desmin, and troponin I genes was assessed using qRT-PCR.

**Results:** The expression of myocardial  $\beta$ MHC, desmin, and troponin I genes was significantly increased in all groups received azacytidine (groups 2 to 6) ( $P < 0.01$ ). There was no significant difference in the expression of myocardial  $\beta$ MHC, desmin, and troponin I genes, the doubling time, and migration between the plasma receiving groups (groups 3 to 6) compared to the group 2 ( $P > 0.05$ ).

**Conclusion:** The findings of present study showed that the plasma collected during ischemia, ischemia-reperfusion, and ischemia preconditioning had no effect on the differentiation of BMMSCs into cardiomyocytes in the presence of azacytidine.

**Keywords:** Mesenchymal stem cells, ischemia preconditioning, plasma, Desmin,  $\beta$ -MHC and troponin I.

**Citation:** Esmailidehaj M, Esmaeili H, Chavoushi E, Rezvani M, Azizian H. **Lack of effect of plasma of myocardial preconditioned, ischemic and ischemic-reperfused rats of myocardium on differentiation of mesenchymal stem cells into cardiomyocytes.** Shahid Sadoughi Uni Med Sci 2022; 30(4): 4778-92

<sup>1</sup>Department of Physiology, Faculty of Medicine, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran.

<sup>2</sup>Pediatric Department, School of Medicine, Golestan University of Medical Sciences, Gorgan, Iran.

\*Corresponding author: Tel: 03538203410, email: elchavoush@gmail.com