مجله دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی- درمانی شهید صدوقی یزد
دوره سیزدهم، شماره پنجم، زمستان ۱۳۸٤، صفحات ٤۰-۳۱

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

دکتر حسین بهاروند*[۱]، رضیه روحانی [۲]، عباس پیریایی[۳]، عادله طائی[٤]، دکتر محمدحسن حیدری[٥]، دکتر احمد حسینی[٦]

چکیده

مقدمه: بیولوژی سلولهای بنیادی موضوع بسیاری از مطالعات اخیر می‌باشد. بن یاخته‌های 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 کاردیومیوسیت‌های مشتق از بن یاخته‌های 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 کاردیومیوسیتها تهیه شدند. کاردیومیوسیتهای دارای ضربان در روزهای ۶ , ۳+۷, ۷+۷, ۱۴+۷ و ۲۱+۷ برداشته شده و جهت مطالعات ایمونوسیتوشیمی و فراساختاری پردازش شدند. کاردیومیوسیتهای جنینی و نوزادی طبیعی ازقلب جنین‌های موش نژاد NMRI ۱۶/۵ روزه و نوزاد ۲ و ۸ روزه نیز گرفته شد تا امکان بررسی مقایسه‌ای فراهم گردد.

نتایج: کاردیومیوسیتهای ابتدایی دستجات میوفیبریلی را به صورت پراکنده و نامنظم با میوفیبریلهای کم و بیش‌موازی نشان دادند و دارای صفحات بینابینی در حال تکامل بودند. به تدریج دستجات میوفیبریلی نظم بیشتری یافتند و به‌صورت سارکومرهای مشخص ظاهر شدند. خطوط تیره Z پررنگ‌تر، میوفیبریلها منظم‌تر و ارگانلهای داخل سلولی تمایز یافته‌تر شدند. در روز ۱۴+۷ باندهای A و I قابل تشخیص شدند. در روز ۲۱+۷ علاوه بر صفحات بینابینی، باندهای A ، I ، H ، خط M، لوله‌های T و شبکه سارکوپلاسمی نیز در سلولها دیده شد. در کاردیومیوسیتهای جنینی ونوزاد دو روزه موشی باند H و خط M قابل تشخیص نبودند. اما در کاردیومیوسیتهای نوزاد هشت روزه باند H و خط M مشاهد شد.

نتیجه‌گیری: مطالعات ایمونوسیتوشیمی و فراساختمانی کاردیومیوسیتهای تمایز یافته نشان داد که بن‌یاخته‌های جنینی‌قادرند به کاردیومیوسیتهای با خواص عملکردی و فراساختاری عضلات قلبی تمایز یابند، و هرچه طول دوره کشت بیشترمی‌شود، کاردیومیوسیتها تکوین یافته‌تر می‌شوند.

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

مقدمه

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

۱*- نویسنده مسئول: استادیار گروه پژوهشی سلولهای بنیادی، پژوهشکده رویان، تهران ، تلفن ۲۲٤۰۲٤۸٦-۰۲۱ Email: Baharvand50@yahoo.com
۲ و۳- کارشناس ارشد گروه آناتومی - مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی
٤- کارشناس گروه پژوهشی سلولهای بنیادی، پژوهشکده رویان
٥-استادیار گروه آناتومی - مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی
٦- استاد گروه آناتومی و رییس مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی
۲و۳و٥و٦- دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی – درمانی شهید بهشتی، تهران
تاریخ دریافت:۸۳/۱۲/۱٥ تاریخ پذیرش: ۸٤/۱۱/۲۷

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2026-11-29]

(Primary culture)کاردیومیوسیتهای قلب تمایز یافته است[۱]. اما کشت‌های اولیه کاردیومیوسیتها به دلیل روشهای جداسازی سلولهای قلب جنینها و حتی در مراحل ابتدایی‌تر، به دلیل مقدار اندک ماده میوکاردی و سختی حفظ مرحله تکوینی در کشت سلولی، مناسب نیستند. لذا راه‌حل دیگر ایجاد رده‌های سلولی (Cell lines) نامیرا برای تمایز کاردیومیوسیتهای 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 کاردیومیوسیتهای 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 کاردیومیوژنز، با استفاده از بن‌یاخته‌های 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 (فیبروبلاستهای جنین موش) و فاکتور ممانعت کننده لوکمیایی (LIF) به صورت نامتمایز باقی می‌مانند[۹]. سلولهای ES در شرایط in-vivo پس‌از انتقال به بلاستوسیست قادرند تا بخشی از فرد را بسازند[۱۰]. در شرایط آزمایشگاهی (in-vitro) نیز می‌توانند به‌طور خودبه‌خود، انواع مشتقات اکتودرمی، مزودرمی و آندودرمی را بسازند. به طوری که ماهیچه اسکلتی، ماهیچه صاف، سلولهای عصبی، سلولهای گلیال، سلولهای اندوتلیال، سلولهای خونی و سلولهای اپی‌تلیال را ایجاد کنند[۱۱]. سلولهای ES علاوه بر دارا بودن قدرت تمایز، ترکیبات ماتریکس برون سلولی نظیر کلاژن، لامینین، نیدوژن و فیبرونکتین را نیز تولید می‌کنند[۱۲،۱۳].

اولین مرحله برای دستیابی به سلولهای تمایز یافته مثل کاردیومیوسیتها تشکیل تجمعات سلولی از بن‌یاخته‌های جنینی‌است. 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].

کاردیومیوسیتها نیز به طورخودبه خود از اجسام شبه جنینی به وجود می‌آیند[۱۸-۱۵]. به غیر از تمایز خودبه‌خود کاردیومیوسیتها از بن‌یاخته‌های 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 کاردیومیوسیتهای مشتق از بن‌یاخته‌های جنینی موش و مقایسه آنها با تکوین کاردیومیوسیتهای طبیعی (in-vivo) موشی انجام شد.

روش بررسی

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

کشت بن‌یاخته‌های جنینی

در این مطالعه از بن یاخته‌های جنینی موش "رویانB1" مشتق از موش نژاد C57BL/6 استفاده شد[۲۰]. سلولهای فوق روی فیبروبلاستهای 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 asids (Gibco, 11140-035)

1000iu/ml Leukemia Inhibitory Factor (LIF) (Chemicon, ESGRO)

تمایز و کشت کاردیومیوسیتها

نحوه ی تمایز کاردیومیوسیتها قبلا بیان شده است[۲۱]، به طور خلاصه تعداد ۸۰۰ بن‌یاخته جنینی در هر قطره (۲۰ µl) از محیط کشت بدون LIF به صورت آویزان (Hanging drop) در درب پتری دیش به مدت ۲ روز کشت داده شد. این عمل به

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2026-11-29]

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 بن‌یاخته‌های بدون LIF کشت داده شدند. محیط کشت سلولها یکروز در میان تعویض گردید. در روز ۷=۲+۵ کشت، اجسام شبه جنینی به پلیت ۲۴ خانه ژلاتینی شده (Sigma G-2500)(0.1w/v) منتقل شدند و در محیط حاویDMEM (Gibco, 12800-017) پنی‌سیلین ـ استرپتومایسین (0.1mM) (Gibco 15140-148) ، بتامرکاپتواتانل(0.1mM) (Sigma, M-7522) اسیدهای آمینه غیر ضروری (0.1mM) (Gibco, 11140-035)، FCS 15% (Gibco, 11140-035) و بیکربنات سدیم (3.7g) (Sigma,S-5761)به‌مدت ۲۱ روز کشت داده شدند (۲۱+۷). نواحی حاوی کاردیومیوسیتهای ضرباندار در روزهای ۶، ۳+۷، ۷+۷، ۱۴+۷ و ۲۱+۷ با میکروسکوپ اینورت فاز کنتراست (Olympus, CKX43)مشاهده و جدا شدند .

ایمونوسیتوشیمی

در روزهای۳+۷ ، ۷+۷ و ۱۴+۷ نواحی ضرباندار ۱۰ـ۵ جسم شبه جنینی به روش مکانیکی تحت میکروسکوپ اینورت فاز کنتراست جدا شده و پس از شستشو در محلول فسفات بافر (PBS) عاری از Mg^{2+} و Ca^{2+} ترپیسینه شدند. سپس سلولهای جدا شده مجددا کشت شده و بعد از یک تا دو روز برای ایمونوسیتوشیمی رنگ‌آمیزی شدند. به‌طوری که سلولها در ابتدا دوبار با PBS شستشو شدند و بعد با محلول متانول: استون (۳ به ۱) در ۲۰- درجه سانتی گراد و یا پارافرمالدیید ۴٪ دردمای اتاق تثبیت شدند. پس از شستشوی مجدد (دوبار با PBS) سلولها با سرم ۱۰٪ بز پوشانده شدند (۳۰ دقیقه) سپس آنتی‌آلفا-اکتینین (Sigma A7811) با غلظت (۱:۸۰۰) 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 آنتی‌بادی 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 فلورسنس مورد ارزیابی قرار گرفتند.

میکروسکوپ الکترونی گذاره

کاردیومیوسیتهای تمایز یافته و نیز قلبهای جنینی و نوزادی نرمال توسط گلوتارالدئید ۲/۵ درصد در بافر فسفات ۰/۱مولار به مدت ۲۴ ساعت و در دمای ۴ درجه سانتی گراد تثبیت اولیه شدند. پس از آن با همان بافر به مدت ۳۰ دقیقه و سه بارتعویض شستشو داده شدند. تثبیت ثانویه با اسمیوم تتراکساید ۱٪ در بافر فسفات ۰/۱ مولار و به مدت ۲ ساعت انجام‌شد و به دنبال آن شستشو با بافر فسفات مجددا به مدت ۳۰ دقیقه و سه بار تعویض انجام شد. مراحل آبگیری در استون با غلظتهای صعودی ۵۰، ۷۰، ۸۰، ۹۰ و ۱۰۰ درصد (II,I) هر یک به مدت ۲۰ دقیقه انجام شد.

آغشتگی با رزین - استون با نسبتهای ۱ به ۳ به مدت یک شب، ۱ به ۱ به مدت ۶ـ۸ ساعت و ۳ به ۱ نیز به مدت یک شب و نهایتاً رزین خالص به مدت ۱۰ـ۸ ساعت انجام شد. پس از آن نمونه‌ها در رزین خالص قالب‌گیری شده و در دمای ۶۰ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت نگهداری شدند تا رزین پلیمریزه شده و سفت گردد. پس ازپلیمریزاسیون بلوکهای رزینی با اولترامیکروتوم (Leica ultracut R) برش داده شدند و برشهای ۶۰ـ۵۰ نانومتری روی گریدهای ۲۰۰ مش مسی (TAAB: GM 032/CR type HR24) برده شدند. گریدها با یورانیل استات ۵ درصد به مدت ۲۰ دقیقه و سیترات سرب ۰/۵ درصد به مدت ۱۰ دقیقه رنگ‌آمیزی شدند. سپس گریدها با میکروسکوپ‌الکترونی گذاره (TEM) مدل Ziess EM900 بررسی و عکسبرداری شدند.

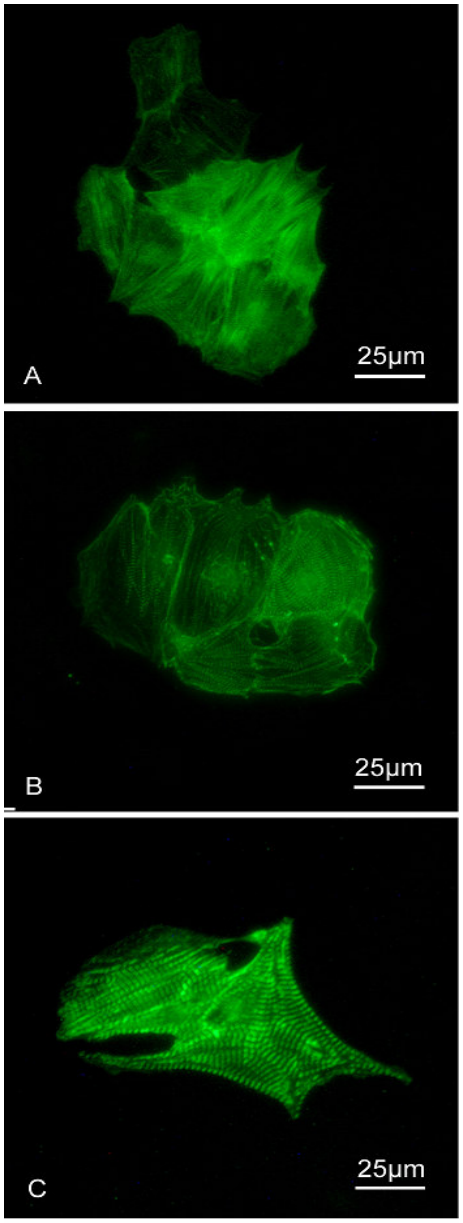
نتایج

تجلی آلفا - اکتینین در طی تکوین کاردیومیوسیتهای مشتق از بن یاخته‌های جنینی

ایمونوسیتوشیمی 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 ـ اکتینین

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2026-11-29]

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



شکل ۱: ایمونوسیتوشیمی کاردیومیوسیتهای مشتق از بن‌یاخته‌های جنینی با استفاده از آنتی‌بادی علیه آلفا-اکتینین در روزهای (A) ۳+۷ ، (B) ۷+۷ و (C) ۱٤+۷.

بررسی فراساختاری کاردیومیوسیتها

اجسام شبه جنینی ٦ روزه

در کاردیومیوسیتهای اجسام شبه جنینی ۶ روزه میوفیلامانها به صورت تجمعات کوچک یا رشته‌های منفرد در سطح سیتوپلاسم پراکنده بودند. همچنین سلولها دارای هسته‌های بزرگ بوده و دانه‌های ترشحی ANF (Atrial Natriuretic Factor) در سیتوپلاسم آنها مشاهده می‌شد (شکل ۲A).

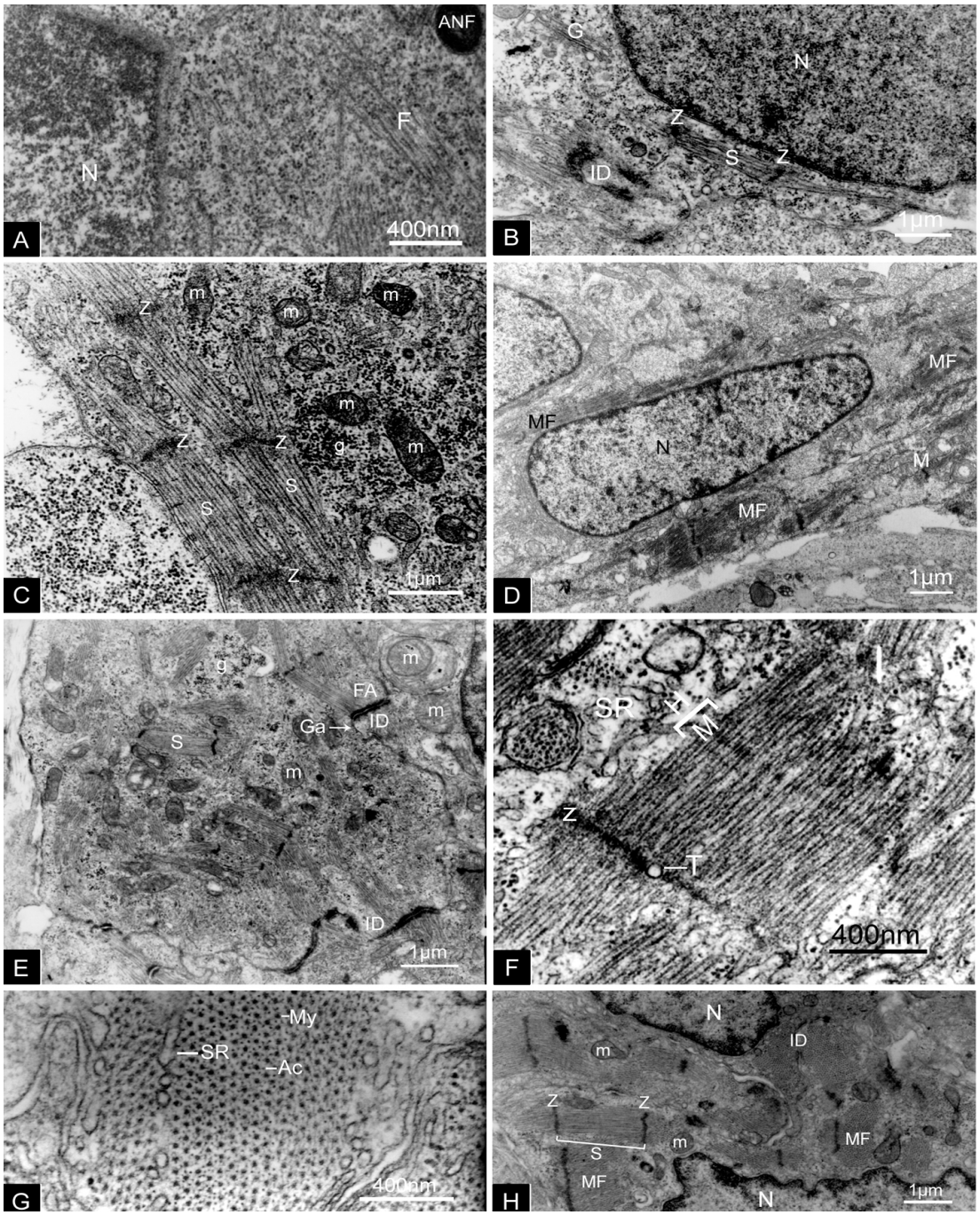
کاردیومیوسیتهای ۳+۷ روزه

کاردیومیوسیتهای ۳+۷ روزه دارای هسته‌های بزرگ بوده و اطراف هسته گرانولهای ANF مشاهده می‌شد. در این سلولها دستجات میوفیبریلی به صورت پراکنده و نامنظم اما گاه به صورت کم و بیش موازی یکدیگر بودند. میوفیبریلها در جهات مختلف آرایش یافته و ضخامت این دستجات در قسمتهای مختلف سلول متفاوت بود. خطوط تیره Z واقع بر روی میوفیبریلها در بعضی نواحی کاملا تشکیل شده اما در بعضی دیگر در حال شکل گرفتن بود. باندهای A و I هنوز به وضوح مشاهده نمی‌شدند. صفحات بینابینی (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. واکوئلهای پینوسیتوتیک نیز در سطح سیتوپلاسم دیده می‌شد. ارگانلهای دیگر سلول مثل شبکه اندوپلاسمیک، دستگاه گلژی و میتوکندریها به وضوح مشاهده می‌شدند. در بعضی نواحی سلول مقطع عرضی میوفیبریلها نیز به چشم می‌خورد (شکل ۲B).

کاردیومیوسیتهای ۷+۷ روزه

در این سلولها دستجات میوفیبریلی نظم بیشتری یافته و به صورت سارکومرهای مشخص دیده می شدند. خطوط تیره Z پررنگتر و قطورتر شده، اما باندهای A و I هنوز قابل تشخیص نبود. میوفیبریلها نیز اغلب موازی یکدیگر بود، اما گاهی در جهات مختلف و به شکل زیگزاگ آرایش یافته بودند. میتوکندریهای فراوان با کریستاهای لوله‌ای به خوبی مشاهده می‌شد. دانه‌های ریبوزوم آزاد و گلیکوژن در سطح سیتوپلاسم به میزان زیاد یافت می‌شد و پلی‌زومها در بین میوفیبریلها قرار گرفته بودند. دستگاه گلژی، شبکه‌سارکوپلاسمیک، وزیکولهای پینوسیتوتیک و نیز تعداد محدودی گرانول ترشحی در سطح سیتوپلاسم مشاهده می‌شد. صفحات بینابینی مشخص با اتصالات مختلف شامل دسموزوم، اتصال بینابینی و اتصال سوراخدار مشاهده می‌گردید (شکل۲C).

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2026-11-29]



اصطلاحات شکلهای ۲ و۳:

A: باند تیره ، Ac: اکتین ، ANF: فاکتور ناتریورتیک دهلیزی ، F: فیلامان ، G: دستگاه گلژی ، g: گلیکوژن ، H: باند H ، I: باند روشن ، ID: صفحات بینابینی ، 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)، ۳+۷ روزه (B) ، ۷+۷ روزه (C)، ۱٤+۷ روزه (D) و ۲۱+۷ روزه (E-H).

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2026-11-29]

کاردیومیوسیتهای ۱٤+۷ روزه

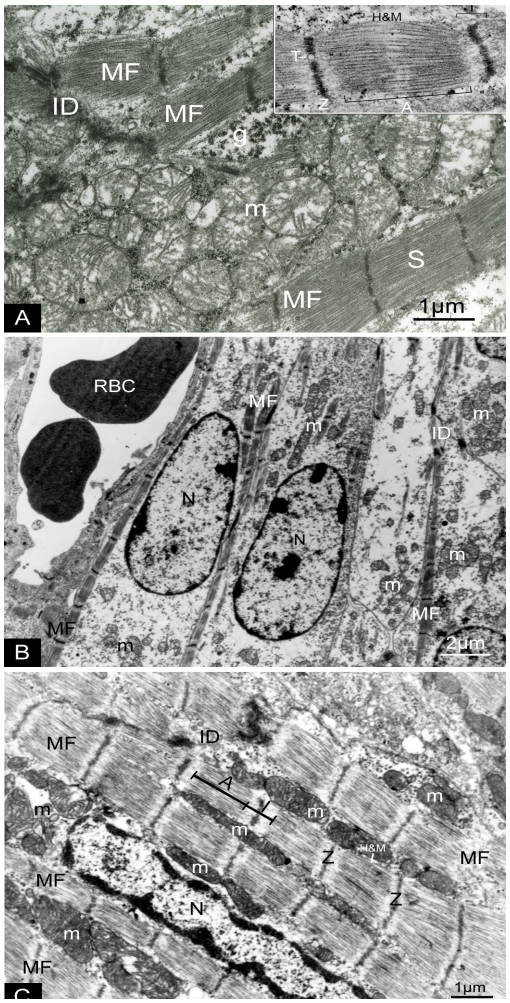
ساختمان سلولی در این سلولها نسبت به گروههای قبلی کاملتر شده بود. به‌طوری که ارگانلهای داخل سلولی به هم فشرده‌تر و نزدیکتر شده بودند. باندهای A و I در این سلولها قابل تشخیص بود. مقدار میوفیبریلها و میتوکندریها بیشتر شده، و گرانولهای ترشحی ANF غشاء دار نزدیک هسته مشاهده می‌شد. صفحات بینابینی بین سلولهای مجاور دیده می‌شد. ارگانلهای سلولی دیگر شامل دستگاه گلژی، 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 میوفیبریلها با هم مشاهده می‌شدند (شکل2D).

کاردیومیوسیتهای ۲۱+۷ روزه

در این سلولها میوفیبریلها به صورت سارکومرهای حجیم و نزدیک به هم با محورهای موازی با یکدیگر وباندهای A و I مشخص دیده می‌شدند و بسیاری از آنها برای تشکیل فیبریلهای بلندتر به هم متصل شده بودند. خطوط Z قطورتر شده و در بعضی از نواحی سیتوپلاسم فضاهای بین میوفیبریلها توسط ردیفهای میتوکندری پر شده بودند. تمام باندهایی که در یک سلول بالغ قلبی دیده می‌شود حتی 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 میوفیبریلی مشاهده می‌شد. در بخشهایی از سلول مقاطع عرضی میوفیبریلها نیز دیده می‌شد که آرایش شش وجهی فیلامانهای اکتین و میوزین آنها قابل توجه بود. صفحات بینابینی بااتصالات مختلف تشکیل دهنده آن به وضوح و فراوان قابل مشاهده بوده، و در سیتوپلاسم مقادیر زیادی میتوکندری دستگاه گلژی، ریبوزوم، شبکه اندوپلاسمی، قطرات چربی و گلیکوژن مشاهده گردید (شکل2E-H).

جنین۱٦/۵ روزه موش

کاردیومیوسیتهای به‌دست آمده از قلب جنین ۱۶/۵ روزه نرمال سلولهایی تک هسته ای با هسته‌های درشت و روشن بودند. در این سلولها ردیفهای سارکومری به صورت



*** اصطلاحات شکل ۳ همانند شکل (۲) می باشد.**

شکل(۳): تصویر میکروسکوپ الکترونی گذاره کاردیومیوسیتهای جنین ۱٦/۵ روزه(A)، نوزاد دو روزه(B) و نوزاد ۸ هشت روزه (C) میوفیبریلهای منظم و موازی با محور طولی سلول آرایش یافته بودند. سارکومرها متشکل 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 بینابینی به وضوح قابل تشخیص بود. تعداد زیادی میتوکندری با کریستاهای لوله‌ای در نواحی مختلف سیتوپلاسم تجمع پیدا کرده بودند. ریبوزومهای آزاد و پلی‌زومها در سیتوپلاسم و در بین میوفیبریلها مشاهده می‌شد. گلیکوژن، گرانولهای ترشحی و

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2026-11-29]

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

نوزاد ۲ روزه موش

در کاردیومیوسیتهای 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 میوفیبریلها شامل میوفیلامانهای اکتین و میوزین با آرایش شش وجهی نیز دیده می‌شد. صفحات بینابینی به تعداد زیاد بین سلولهای مجاور ارتباط ایجاد کرده‌اند (شکل۳B).

نوزاد ۸ روزه موش

در کاردیومیوسیتهای نوزاد ۸ روزه دستجات سارکومری منظم و بالغ، کاملا موازی با یکدیگر و در جهت محور طولی سلول جلب توجه می‌کرد. باندهایA و I در همه قسمتها بسیار منظم و شکیل مشابه نمونه‌های بالغ به چشم می‌خورد. علاوه بر آن باند H و همچنین خط M هم در بسیاری از قسمتها قابل رؤیت بود. متیوکندریها بسیار بزرگ بوده و در فواصل سارکومرها به صورت موازی با آنها ردیف شده بودند. سارکوپلاسمیک رتیکولوم گسترده در سطح سیتوپلاسم مشاهده می‌شد. لوله‌های T درشت بوده و به فراوانی یافت می‌شدند. کپلکسهای صفحات بینابینی به صورت پیچیده‌تر و در هم فرورفته‌تر از قبل مشاهده می‌شدند (شکل ۳C).

بحث

تولید کاردیومیوسیتهای با ساختار و عملکرد مناسب از بن‌یاخته‌های جنینی کاربردهای بالقوه بسیاری دارد که از آن‌جمله درمان میوکارد از طریق پیوند سلولی می‌باشد. چنین کاربردهایی در مدلهای حیوانی نشان داده شده‌است [۲۲-۲۴]. بیشتر آنچه که ما در مورد تمایز بن‌یاخته‌های جنینی پرتوان به کاردیومیوسیت در محیط آزمایشگاه می‌دانیم از مطالعات بن‌یاخته‌های جنینی موش به دست آمده است. این سلولها موضوع تلاش تحقیقاتی بسیاری بوده و در آینده نیز خواهند بود. یافته‌های ما نشان داد که بن‌یاخته‌های جنینی موش می‌توانند به‌طور مؤثری به کاردیومیوسیتهای تیپیک و سالم از نظر هیستولوژی تمایز یابند. این نتایج براساس: ۱) توانایی ایجاد ضربان و انقباض این سلولها در محیط کشت ۲) ایمونوسیتوشیمی با استفاده از آنتی‌بادیهای علیه پروتئین های ماهیچه‌ای ۳) بررسی فراساختاری این سلولها توسط میکروسکوپ الکترونی گذاره به دست آمد.

در طی بلوغ کاردیومیوسیتها در in-vitro ظاهر کلی آنها به صورت کشیده و با میوفیبریلهای تکوین یافته تبدیل می‌شد. آلفا ـ اکتینین در سلولهای بیان کننده آن، به صورت پراکنده در اطراف سیتوپلاسم در مراحل ابتدایی تکامل، تا ساختارهای سارکومری کامل ومیوفیبریلهای سازمان یافته در سلولهای کشیده، در مراحل پیشرفته تر دیده شدند. بررسی کاردیومیوسیتهای تمایز یافته نشان داد که این‌سلولها عمدتا تک هسته‌ای و با هسته گرد تا کشیده هستند. این سلولها درجات مختلفی از سازمان‌بندی دستجات میوفیبریلی از مرحله ابتدایی تا نهایی را نشان دادند. در ابتدا خطوط Z به صورت نقاطی پراکنده دیده شده و میوفیلامانها نامنظم و فاقد آرایش خاصی بودند و باندهای A و I مشاهده نشدند. اما با تکوین بیشتر خطوط Z کامل شده، باندهای A ، I و H ، خط M ، لوله های T و صفحات‌بینابینی پدیدار شدند. مطالعات قبلی طی کاردیوژنز در محیط in-vivo نیز نشان داده است که میوفیبریلها در ابتدا، پراکنده و نامنظم هستند و به تدریج به آرایش موازی و در نهایت به صورت سارکومرهای متراکم درمی‌آیند [۲۵،۲۶]. در این مطالعه کاردیومیوسیتهای مجاور درجات متفاوتی از سازمان بندی میوفیبریلی را نشان می‌دادند. همچنین در یک سلول درجات متفاوتی از سرهم‌بندی (Assemble) میوفیبریلی و سازمان بندی مختلف سارکومری دیده می‌شد. خطوط Z، نوارهای I و A، لوله‌های T و صفحات بینابینی شامل اتصالات بینابینی، اتصالات روزنه دار و دسموزومها در کاردیومیوسیتهای مشتق از بن‌یاخته‌های جنینی مشاهده شدند. فاصله بین خطوط Z در روز ۲۱+۷حدود ۲μm بود. لوله‌های T، باند H و خط M در بعضی سلولها در روز ۲۱+۷ مشاهده شد. این ساختارها قبلا

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2026-11-29]

درکاردیومیوسیتهای مشتق از بن‌یاخته‌های جنینی موش گزارش نشده بود. Hescheler و همکاران [۲۷] و Kehat وهمکاران [۱۶] گزارش کردند که در مقایسه با کاردیومیوسیتهای بالغ لوله‌های T، نوار H و خط M درکاردیومیوسیتهای مشتق از بن‌یاخته‌های جنینی موشی و انسانی وجود ندارند. سیستم لوله T و نوار M به عنوان نقطه‌نهایی بلوغ میوفیبریلی هستند و بعد از تولد تکوین می‌یابند [۲۸،۲۹] و احتمالا با فشارهای مکانیکی در ضربان قلب‌مرتبط هستند. حضور این ساختارها در کاردیومیوسیتهای مشتق از بن‌یاخته‌های جنینی، احتمالا 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 کاردیومیوسیتهای 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 کاردیومیوسیتهای مشتق از بن‌یاخته‌های جنینی انسان، به دنبال شصت روز کشت اجسام شبه جنینی گزارش نمودند، اما لوله‌های T را در هیچ‌کدام از سلولهای موردنظر نیافتند [۳۱]. لازم به ذکر است که در مطالعات قبلی، کاردیومیوسیتها 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 B1 اخذ شد [۲۱]. در مطالعه دیگری مشاهده نمودیم که با کشت کاردیومیوسیتها بر ماده زمینه برون سلولی اختصاصی (کاردیوژل) مشتق از فیبروبلاستهای قلبی، این سلولها زودتر بالغ می‌شوند و در روز ۱۴+۷ لوله‌های T، باند H و خط M در بعضی سلولها دیده می‌شوند [۳۲].

مقادیر فراوان ریبوزومهای آزاد و پلی‌زومها که به طور گسترده در سلول عضله قلبی در حال تکامل یافت می‌شود در کاردیومیوسیتهای در حال تمایز در سراسر تکامل در مطالعه حاضر مشاهده شد. این ریبوزومها احتمالا با فیبریلهای درحال تمایز همراه می‌باشند به‌طوری که هر چه فیلامانها بیشتر شکل می‌گیرند و به فیبریلها 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 درمیکروگرافهای الکترونی مشکل است. اما در کل با استفاده از رنگ‌آمیزی‌های مختلف می‌توان گلیکوژن ها را که رنگ کمی می‌گیرند از پلی‌زومها که به نسبت رنگ بیشتری می‌گیرند افتراق داد. همچنین گلیکوژن‌ها معمولا به صورت دانه‌های به هم 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 کاردیومیوسیتها در محیط آزمایشگاهی هستند و امکان تولید کاردیومیوسیتهایی با خصوصیات فراساختاری بالغ از بن یاخته‌های 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 نگارندگان مقاله بر خود فرض می‌دانند که از همکاری صمیمانه مسئولین هر دو مرکز قدردانی نمایند

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 immortalizedclonal 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***

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2026-11-29]

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 Chem1988; 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 moue 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 in tegrin- deficient cells.*** Dev Biol 1996; 179: 184-196.

13- Fassler R, Sasaki T, Timpl R, Chu ML, Werner S. ***Differential regulation offibulin, 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, SoregH, Benvenisty N. ***Differentiation of human embryonic stem cells into ebmryoidbodies 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 emryonic stem cells developmentally express cardiacspecific 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, Gepstin 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, Doevendans P, Spijker R, Van den Brink S, Hassink R, Van der Heyden M, Opthof T, Pera M, De la Riviere AB, Passier R, Tertoolen L. ***Differentiation of human embryonic stem cells to cardiomyocytes: role of co-culture with ivsceral endoderm-like cells***. Circulation 2003; 107:

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2026-11-29]

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.

۲۱- بهاروند حسین ، آذرنیا مهناز ، پریور کاظم ، کاظمی آشتیانی سعید . ***خصوصیات کرونوتروپی (ضرباهنگی) سلولهای عضله قلبی مشتق از بن یاخته‌های جنینی.*** مجله علمی ـ پژوهشی کوثر، ۱۳۸۳،شماره ۹، صفحات ۲۷۱-۲۶۱.

22- Fraidenraich D, Stillwell E, Romero E, Wilkes D, Manova K, Basson CT, Benezra 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 ultrasturcture of developing myocadium 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 immunocyto-chemical 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 Physoil 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.

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2026-11-29]