Original Article

Effect of glucose on improvement of BM-MSC differentiation into cardiomyocyte - like cells

Sara Raisolsadati, M.Sc Student in Medical Biotechnology, Department of Medical Biotechnology, School of Advanced Technologies in Medicine, Golestan University of Medical Sciences, Gorgan, Iran. ORCID ID: 0000-0002-3626-2462

Abdoljalal Marjani (Ph.D), Professor, Metabolic Disorders Research Center, Department of Biochemistry and Biophysics, Gorgan Faculty of Medicine, Golestan University of Medical Sciences, Gorgan, Iran. ORCID ID: 0000-0003-2826-5951

***Safoura Khajeniazi (Ph.D)**, **Corresponding Author**, Assistant Professor, Stem Cell Research Center, Department of Medical Technology, Faculty of Advanced Technologies in Medicine, Golestan University of Medical Sciences, Gorgan, Iran. **E-mail: niazie80@gmail.com**
ORCID ID: 0000-0002-3915-4635

Abstract

Background and Objective: Cardiovascular diseases and heart failure are major diseases in developed countries. Stem cells showed specific features to play an important role in heart disease treatment. One of the most common compounds has been used to induce differentiation of stem cells into cardiomyocyte is 5-Azacytidine. Medium contents of cell culture such as different glucose concentrations also influence on morphology and function of final differentiated cells. This study was done to evaluate the effect of glucose on improvement of BM-MSC differentiation into cardiomyocyte - like cells.

Methods: In this experimental study, effect of two different glucose concentrations (5 and 25mM) on the mesenchymal stem cells differentiation (MSCs) to cardiomyocytes during 21 days was evaluated. Bone marrow MSCs (BM MSCs) seeded in differentiation medium which treated with 5-aza and 5 & 25mM glucose concentrations. In next step, total RNA was extracted and cDNA synthesis was carried out. Finally, quantitative polymerase chain reaction (Q-PCR) was done to determine level of cardiac-specific markers during differentiation process including Connexin43, α-cardiac actin, TroponinT and TroponinI.

Results: Level of cardiac-specific markers during differentiation of mesenchymal stem cells to cardiomyocyte including Connexin43, α-cardiac actin, TroponinT and TroponinI in 5 and 25 mM of glucose concentration was diferent, but this diference was not significant.

Conclusion: Our results showed that two concentrations of glucose (5, 25mM) have no remarkable effect on the expression of cardiac markers during differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells to cardiomyocyte.

Keywords: Cardiomyocyte, Mesenchymal stem cell, Glucose, 5-Azacytidine, Cardiac-specific markers

Received 5 Feb 2019 **Revised** 3 Mar 2019 **Accepted** 23 Apr 2019

Cite this article as: Sara Raisolsadati, Abdoljalal Marjani, Safoura Khajeniazi. [Effect of glucose on improvement of BM-MSC differentiation into cardiomyocyte - like cells]. J Gorgan Univ Med Sci. 2019 Autumn; 21(3): 41-48. [Article in Persian]

تحقیقی

اثر گلوکز بر بهینه‌سازی پروتکل تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان انسان به سلول‌های شبه کاردیومیوسیت

سارا رئیس الساداتی، دانشجوی کارشناسی ارشد رشته بیوتکنولوژی پزشکی، دانشکده فناوری‌های نوین، دانشگاه علوم پزشکی گلستان، گرگان، ایران. ORCID ID: 0000-0002-3626-2462

دکتر عبدالجلال مرجانی، استاد، مرکز تحقیقات بیماری‌های متابولیک، گروه بیوشیمی و بیوفیزیک، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی گلستان، گرگان، ایران. ORCID ID: 0000-0003-2826-5951

*** دکتر صفورا خواجه نیازی**، استادیار، مرکز تحقیقات سلول‌های بنیادی، گروه زیست فناوری پزشکی، دانشکده فناوری های نوین علوم پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی گلستان، گرگان، ایران. ORCID ID: 0000-0002-3915-4635

چکیده

زمینه و هدف: *بیماری‌های قلبی - عروقی و از کار افتادن قلب از مهم‌ترین بیماری‌هایی هستند که جوامع تکامل یافته را درگیر می‌کنند. سلول‌های بنیادی می توانند نقش مهمی در تیمار بیماری قلبی بازی کنند. یکی از شایع‌ترین ترکیبات مورد استفاده برای القا تمایز سلول‌های بنیادی به کاردیومیوسیت، ۵-آزاسیتیدین است. محتوای محیط کشت سلولی بر مورفولوژی و کیفیت سلول‌های تمایز یافته موثر است. این مطالعه به منظور تعیین اثر گلوکز بر بهینه سازی پروتکل تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان انسان به سلول‌های شبه‌کاردیومیوسیت انجام شد.*

روش بررسی: *در این مطالعه تجربی سلول‌های بنیادی مزانشیمی در محیط تمایزی حاوی ۵-آزاسیتیدین و دو غلظت از گلوکز (۵ و ۲۵ میلی‌مولار) طی ۲۱ روز کشت داده شدند. در مرحله بعد RNA کل استخراج و cDNA سنتز شد. سرانجام q-PCR برای تعیین مارکرهای ویژه قلبی و تایید تمایز انجام گردید. تمایز سلول های بنیادی مزانشیمی به سلول های کاردیومیوسیت با استفاده از چهار مارکر قلبی Connexin43، α-cardiac actin، TroponinT و TroponinI به‌روش q-PCR اندازه‌گیری و تایید شدند.*

یافته‌ها: *میزان بیان مارکرهای قلبی Connexin43، α-cardiac actin، TroponinT و TroponinI در هر دو غلظت ۵ و ۲۵ میلی‌مولاری گلوکز طی تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان انسان به کاردیومیوسیت متفاوت بود؛ اما این تفاوت از نظر آماری معنی‌دار نبود.*

نتیجه‌گیری: *دو غلظت ۵ و ۲۵ میلی‌مولاری گلوکز اثر قابل ملاحظه‌ای بر بیان مارکرهای قلبی Connexin43، α-cardiac actin، TroponinT و TroponinI طی تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان انسان به کاردیومیوسیت نداشتند.*

کلید واژه‌ها: *کاردیومیوسیت ، سلول‌های بنیادی مزانشیمی ، گلوکز ، ۵-آزاسیتیدین ، مارکرهای قلبی*

* نویسنده مسؤول : دکتر صفورا خواجه نیازی ، پست الکترونیکی niazie80@gmail.com

نشانی : گرگان، دانشگاه علوم پزشکی گلستان، دانشکده فناوری های نوین علوم پزشکی، گروه زیست فناوری پزشکی ، تلفن و نمابر ۳۲۴۵۲۶۵۱-۰۱۷

وصول مقاله: ۱۳۹۷/۱۱/۱۶ ، اصلاح نهایی: ۱۳۹۷/۱۲/۱۲ ، پذیرش مقاله: ۱۳۹۸/۲/۳

مقدمه

یکی از علل اصلی مرگ در کشورهای تکامل یافته بیماری های قلبی - عروقی و از کار افتادن قلب است (۱). بعد از رویداد بیماری قلبی - عروقی مانند انفارکتوس میوکارد، تعداد زیادی از کاردیومیوسیت‌ها بدون هیچگونه قابلیت خودتجدیدپذیری در همان ناحیه از بین می‌روند. کاربرد سلول‌های بنیادی در درمان و پزشکی بازساختی به عنوان یک رویکرد جدید در درمان بیماری‌های قلبی - عروقی شناخته شده است. در حال حاضر چندین رده از سلول‌های بنیادی از منابع مختلف در درمان بیماری‌های قلبی به‌کار برده می‌شوند. از جمله آنها می‌توان به پروژنیتور اندوتلیال، پروژنیتور قلبی، مزانشیمی مغز استخوان، سلول‌های بنیادی رویانی و iPS اشاره نمود (۲).

سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان در مقایسه با سلول‌های دیگر پتانسیل بیشتری برای تمایز به سایر رده‌ها مانند کاردیومیوسیت را دارند. این سلول‌های بنیادی کاندیدهای مهمی برای کاربرد در پزشکی بازساختی هستند تا جایگزین سلول‌های آسیب‌یافته شوند. سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان قادرند تا سلول‌های قلبی را ترمیم کنند (۶-۳). به دلیل محدودیت‌های سلول‌های قلبی از جمله محدود بودن تعداد آنها، بافت میوکاردیال بالغ هیچ ظرفیتی برای ترمیم نواحی آسیب‌یافته یا جایگزین سلول‌های طبیعی ندارد. این فرایند می‌تواند به از کار افتادن پیشرونده قلبی بعد از انفارکتوس میوکارد منجر شود (۱و۶و۷).

عوامل زیادی شامل ۵-آزاسیتیدین، اکسی توسین، آنژیوتانسین و اجزای محیط کشت می‌تواند تمایز سلول‌های بنیادی به

کاردیومیوسیت را القاء داده یا تحت تاثیر قرار دهد (۸). ۵-آزا سیتیدین اثرات متناقضی طی تمایز کاردیومیوسیت از سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان به‌دست آمده از گونه‌های مشابه مانند انسان، موش صحرایی و murine دارد (۹). ۵-آزا سیتیدین نقش معکوس در فرایند تمایز کاردیومیوسیت از سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از موش صحرایی و انسان بازی می‌کند. این ترکیب قادر به تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی موش صحرایی به کاردیومیوسیت نیست (۱۰). یکی از چالش‌های کاربرد سلول‌های بنیادی در سلول درمانی و پزشکی بازساختی، بهینه‌سازی پروتکل تمایز است. سطح بالای گلوکز می‌تواند منجر به پیری سلولی در سلول‌های بنیادی موش صحرایی شود. در مقابل، سطح پایین گلوکز ممکن است باعث آثار معکوس مانند افزایش تکثیر، کاهش آپوپتوز و به دنبال آن باعث افزایش تعداد واحدهای تشکیل دهنده کلونی باشد (۱۳-۱۱).

سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان murine در حضور ۵-آزاسیتدین پتانسیل توانایی تمایز به سلول‌های قلبی ضربان‌دار را دارند. سطح بالای گلوکز طی تمایز کاردیومیوسیت از سلول‌های بنیادی رویانی این فرایند را سرکوب و از بلوغ کاردیومیوسیت‌ها جلوگیری می‌کند (۱۴). با توجه به این که منبع اصلی تامین انرژی سلول‌های عضله قلب در حالت نرمال اسیدهای چرب است و در شرایط بیماری این منبع از اسیدچرب به گلوکز تغییر می‌یابد؛ مطالعات معدودی در ارتباط با نقش گلوکز در تمایز، بلوغ و کیفیت سلول‌های کاردیومیوسیت انجام شده است. تیمار طولانی مدت با گلوگز سلول‌های امبریوکارسینوما منجر به مهار کاردیوژنز در آنها می‌شود (۱۵). تیمار طولانی مدت سلول‌های P19CL6 با گلوکز در غلظت ۲۵ میلی‌مولار از تمایز این سلول‌ها به کاردیومیوسیت جلوگیری نموده و غلظت‌های ۵، ۶ و ۱۰ میلی‌مولار باعث القا تمایز می‌شوند (۱۶). علاوه بر این مشخص شده گلوکز در غلظت‌های بالا تمایز سلول‌های بنیادی رویانی انسانی به کاردیومیوسیت و همچنین بلوغ قلبی را سرکوب می‌کند (۱۷). در مطالعه قبلی ما اینترلوکین ۱بتا و ۵-آزاسیتیدین بر تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان به سلول‌های شبه‌کاردیومیوسیت، اثر هم‌افزایی داشت (۱۸). به‌نظر می‌رسد غلظت‌های متفاوت گلوکز در تمایز رده‌های مختلف سلولی به کاردیومیوسیت اثر متفاوتی داشته باشد. با توجه به تناقضات مطالعات قبلی و این که یکی از چالش‌های مهم در سلول درمانی بیماری‌های قلبی استفاده از سلول‌های بنیادی مزانشیمی است؛ ضمن این که تاکنون راهکاری ساده که بدون ایجاد تغییرات وسیع منجر به ایجاد کاردیومیوسیت‌های دارای عمل باشد؛ معرفی نشده است؛ این مطالعه به منظور تعیین اثر گلوکز بر بهینه سازی پروتکل تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان انسان به سلول‌های شبه کاردیومیوسیت انجام شد.

روش بررسی

این مطالعه تجربی در دانشکده فناوری های نوین دانشگاه علوم پزشکی گلستان طی سال های ۹۶-۱۳۹۵ انجام شد و مورد تایید کمیته اخلاق (IR.GOUMS.REC.1394.52) دانشگاه علوم پزشکی گلستان قرار گرفت.

مواد شیمیایی و معرف‌ها: همه مواد لازم برای انجام کشت سلولی شامل FBS، L-glutamin، تریپسین-EDTA، محیط‌های با گلوکز بالا و پایین و پنی سیلین - استرپتومایسین از Invitrogen-Gibco خریداری شد. کیت استخراج RNA از کمپانی کیاژن و ۵-آزاسیتیدین از شرکت سیگما تهیه شد. SYBR Green Master Mix از کمپانی آمپلیکون و کیت سنتز cDNA از شرکت کیاژن خریداری شدند. کلیه مواد لازم برای PCR از شرکت Bioron تهیه شدند. سلول بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان از شرکت فن‌آوری بن یاخته خریداری گردید.

کشت سلول و تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان به سلولهای شبه کاردیومیوسیت: سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان که در پاساژ دوم بودند؛ در پلیت‌های ۶ چاهکی و در هر چاهک ۲۰۰۰۰۰ سلول کشت داده شدند. بعد از گذشت ۲۴ ساعت از کشت سلول، محیط رویی برداشته و پلیت‌ها دو بار با فسفات بافر سالین شستشو داده شدند و سپس با محیط جدید حاوی FBS ۱۰درصد، ۱۰ میکرومول ۵-آزاسیتیدین، ۱۰۰UI/ml پنی سیلین - استرپتومایسین جایگزین و در انکوباتور ۳۷۰ و کربن دی اکسید ۵ درصد قرار داده شدند. مراحل فوق در دو شرایط غلظتی متفاوت گلوکز انجام شد. به این صورت که یک‌بار غلظت گلوکز محیط کشت ۵ میلی‌مولار و یک‌بار دیگر ۲۵میلی‌مولار تنظیم و به ترتیب به‌عنوان غلظت پایین و غلظت بالای گلوکز در نظر گرفته شدند. به این منظور همه سنجش‌ها به دو گروه تقسیم شدند. پلیت‌های گروه اول غلظت

جدول ۱ : توالی پرایمرهای استفاده شده در Q-PCR

Gene	Forward primer sequence	Reverse primer sequence	Product size (bp)
GAPDH	GACAACAGCCTCAAGATCATCAG	ATGGCATGGACTGTGGTCATGAG	۱۲۲
α-cardiac actin	AAGCAAAAGAGTGGTGCCCAG	CCAGCAGCAGGATTCGGAAA	۱۶۶
TroponinI	CCAGGGCAGAAGAAGATG	CCACTCTCTCTCCATCGG	۱۳۵
TroponinT	GACACCGAGAAGGAAAACC	GGCAGTAGGCAGGAAGG	۱۱۴
Conexin43	CCGTACCACAGGCATTGTTC	GACAAAGGAGTAGCCACGCT	۱۳۸

۱۰ میکرومولار از ۵-آزاسیتیدین دریافت کردند و در محیط کشت DMEM گلوکز پایین (۵ میلی‌مولار) کشت داده شدند. پلیت‌های گروه دوم در محیط کشت DMEM گلوکز بالا (۲۵میلی‌مولار) ۱۰میکرومولار ۵-آزاسیتیدین دریافت کردند. همه نمونه‌ها به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند. سپس سلول‌ها دوبار با PBS شسته و محیط تازه بدون ۵-آزاسیتیدین به چاهک‌ها اضافه شد. طی فرایند تمایز، محیط کشت هر سه روز یک بار به مدت ۳ هفته تعویض شد. همزمان با سایر چاهک‌ها یک چاهک نیز به سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان تمایز نیافته به عنوان گروه کنترل اختصاص داده شد که همه موارد محیط کشت به غیر از ۵ آزاسیتیدن را دریافت کردند.

استخراج RNA و سنتز cDNA و Real Time PCR برای بیان مارکرهای قلبی طی تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان به سلول‌های شبه کاردیومیوسیت: سطح بیان مارکرهای قلبی به عنوان تایید صحت تمایز و تبدیل سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان به سلول‌های شبه‌کاردیومیوسیت به‌کار برده شد. برای رسیدن به این هدف بیان مارکرهای قلبی شامل تروپونین I قلبی (cTnI)، تروپونین T قلبی (cTnT)، کانکسین ۴۳ (connexin43) و آلفا کاردیاک اکتین (α-cardiac actin) در سطح RNA با استفاده از Real Time PCR اندازه‌گیری شدند. استخراج RNA از کلیه نمونه‌ها با استفاده از کیت استخراج RNA در روزهای صفر، ۷، ۱۴ و ۲۱ انجام شد. روز صفر سلول‌های بنیادی تمایز نیافته به عنوان کنترل انتخاب شدند. بعد از سنتز cDNA با به‌کار گرفتن کیت سنتز cDNA، با استفاده از پرایمرهای اختصاصی مارکرهای قلبی Real Time PCR انجام شد (جدول یک).

برای انجام Q-PCR مخلوط واکنش شامل ۰/۱ µmol/l SYBR Green Master Mix از هر پرایمر تهیه شد. سپس ۱۰۰ نانوگرم از cDNA اضافه شد و با استفاده از آب مقطر دوبار تقطیر حجم نهایی مخلوط به ۲۰ میکرولیتر رسانده شد. واکنش PCR بعد از تهیه مخلوط واکنش انجام شد. پروفایل دمایی شامل دناتوره شدن اولیه در ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه در ادامه ۴۰ سیکل واکنش شامل دناتوره شدن در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ ثانیه، چسبیدن پرایمرها در دمای ۶۰ درجه‌سانتی گراد به مدت یک دقیقه بود. GAPDHبه عنوان کنترل داخلی استفاده شد.

آنالیز آماری: کلیه محاسبات آماری با استفاده از نرم‌افزار Graph PadPrism6 و در زمان‌های بینابینی دوره تمایز با روش One-Way ANOVAدر سطح معنی‌داری کمتر از ۰/۰۵ انجام شد. همه سنجش‌های Real Time PCR بر روی همه نمونه‌ها به صورت ۳ بار تکرار و هر تکرار دوتایی انجام و تغییرات نسبت بر اساس متد 2-ΔΔct محاسبه و نتایج بر اساس Fold change گزارش گردید.

یافته‌ها

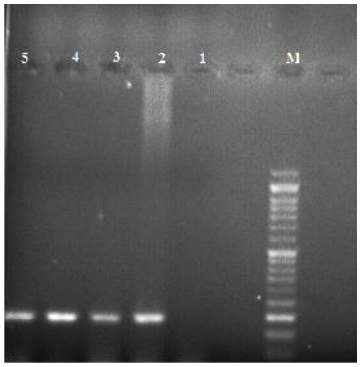
اولین رویداد قابل مشاهده طی تمایز تغییر مورفولوژی سلول‌ها بود. طی تمایز مورفولوژی سلول‌های بنیادی مزانشیمی از فرم دوکی شکل به فرم کروی تبدیل شدند؛ اما سلول‌های شبه قلبی حاصل هیچگونه ضربانی نشان ندادند.

محصول PCR بر روی ژل الکتروفورز منتقل شد و باند مربوط به هر مارکر قلبی در شکل‌های ۱ و ۲ و ۳ قابل مشاهده است.

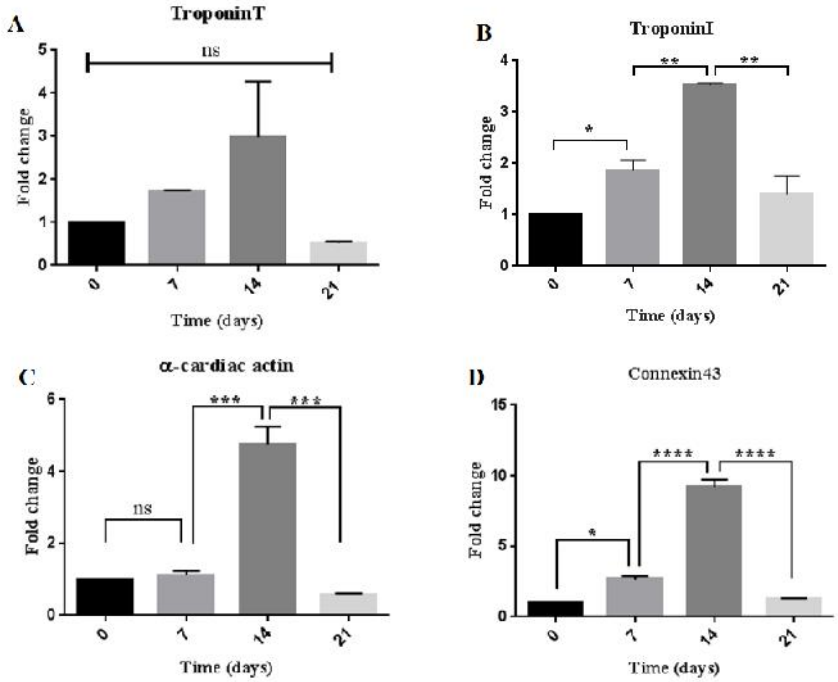
سطح همه مارکرهای قلبی طی تمایز تا روز ۱۴ تمایز افزایش و سپس تا روز ۲۱ کاهش یافتند. بررسی سطح بیان مارکرهای کاردیومیوسیت در سطح mRNA طی تمایز نشان داد که Connexin43 و α-cardiac actin نسبت به TroponinI و TroponinT افزایش بیشتری داشتند (P<۰/۰۵) (نمودار یک).

بررسی سطح بیان مارکرهای کاردیومیوسیت در سطح mRNA طی تمایز نشان داد که Connexin43 و α-cardiac actin نسبت به TroponinI و TroponinT افزایش بیشتری داشتند. طی تمایز در محیط حاوی گلوکز بالا مشاهده شد که بیان همه مارکرهای قلبی تقریباً در روز ۱۴ تمایز افزایش داشتند (نمودار ۲).

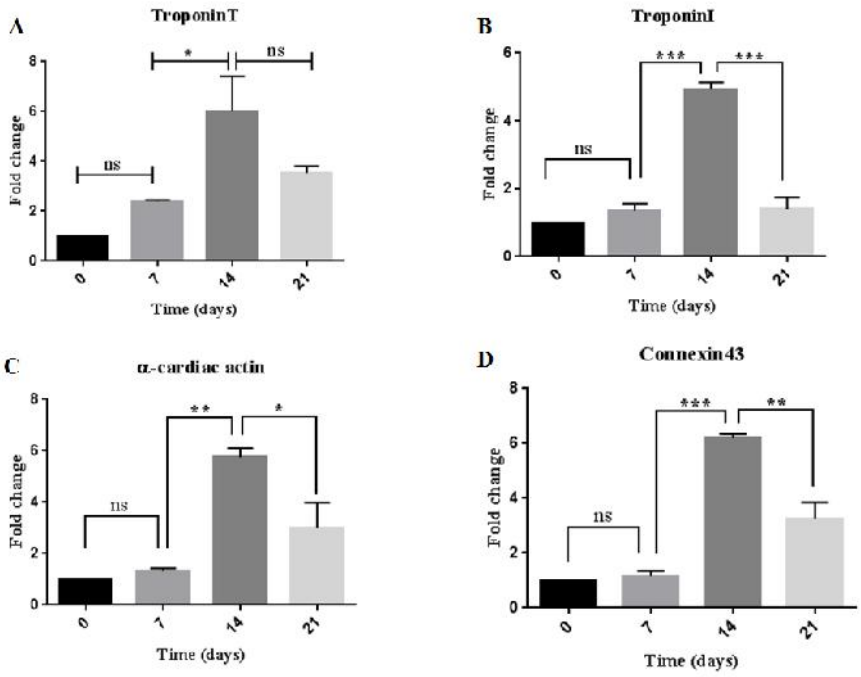
سرعت تمایز کاردیومیوسیت در دو غلظت متفاوت گلوکز تقریباً با هم برابر بود؛ اما سطح تغییرات بیان مارکرهای قلبی متغیر بود. اثر دو غلظت متفاوت گلوکز طی تمایز بر بیان مارکرهای قلبی متفاوت بود. نتایج Q-PCR دلالت بر این داشت که سطح بیان مارکرهای قلبی در طول تمایز افزایش یافته است. افزایش سطح بیان مارکرهای قلبی طی تمایز کاردیومیوسیت در هر دو غلظت بالا و پایین گلوکز با هم یکسان نبود. افزایش بیان مارکرهای قلبی در غلظت ۲۵ میلی‌مولار گلوکز بیشتر از میزان بیان مارکرها در غلظت ۵ میلی‌مولار گلوکز بود؛ اما این تفاوت از لحاظ آماری معنی‌دار نبود.



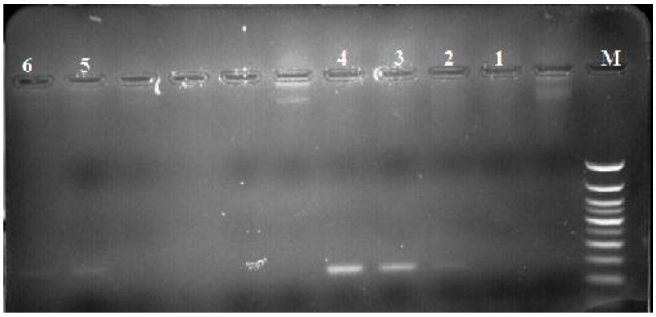
شکل ۱ : تصویر ژل الکتروفورز حاصل از Real Time PCR برای تایید دقت استخراج RNA و سنتز cDNA برای ژن GAPDH ستون M : سایز مارکر، ستون ۱ : کنترل منفی، ستون‌های ۲ و ۳ و ۴ و ۵ مربوط به ژن GAPDH (122bp)



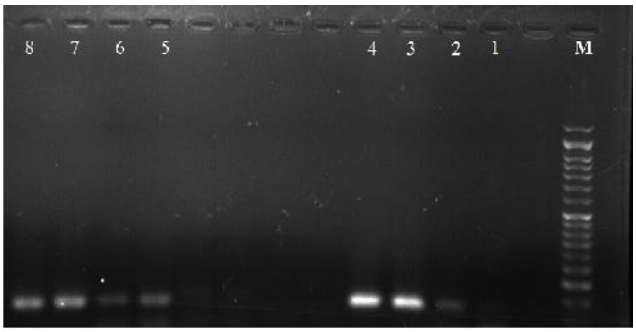
نمودار ۱ : Q-PCR مارکرهای قلبی برای تعیین بیان ژن در سطح mRNA طی تمایز قلبی از سلول‌های بنیادی مزانشیمی در غلظت پایین گلوکز (۵ میلی‌مولار) در روزهای صفر و ۷ و ۱٤ و ۲۱
Connexin43 (D ، α-cardiac actin (C ، TroponinC (B ، TroponinT (A
P<۰/۰۵ به‌عنوان معنی‌داری تفاوت مقایسه با گروه کنترل در نظر گرفته شد.
ns : عدم معنی‌داری. روز صفر (سلول‌های بنیادی تمایز نیافته) به عنوان کنترل انتخاب شد.



نمودار ۱ : Q-PCR مارکرهای قلبی برای تعیین بیان ژن در سطح mRNA طی تمایز قلبی از سلول‌های بنیادی مزانشیمی در غلظت پایین گلوکز (۲۵ میلی‌مولار) در روزهای صفر و ۷ و ۱٤ و ۲۱
Connexin43 (D ، α-cardiac actin (C ، TroponinC (B ، TroponinT (A
P<۰/۰۵ به‌عنوان معنی‌داری تفاوت مقایسه با گروه کنترل در نظر گرفته شد.
ns : عدم معنی‌داری. روز صفر (سلول‌های بنیادی تمایز نیافته) به عنوان کنترل انتخاب شد.



شکل ۲ :تصویر ژل الکتروفورز حاصل از Real Time PCR مارکرهای قلبی
ستون M: سایز مارکر، ستون ۱ : کنترل منفی، ستون‌های ۲و۳ : α-cardiac actin (166bp)، ستون ٤: Connexin 43 (138bp)
ستون ٥ : TroponinI (135bp) ، ستون ٦ : TroponinT (114bp)



شکل ۳ : تصویر ژل الکتروفورز مربوط به Real Time PCR مارکرهای قلبی
ستون M: سایز مارکر، ستون ۱ : کنترل منفی، ستون ۲ : TroponinT (114bp) ، ستون‌های ۳ و ٤ : GAPDH (122bp)
ستون‌های ٥ و ٦ : TroponinI (135bp) ، ستون‌های ۷ و ۸ : Connexin 43 (138bp)

بحث

نتایج مطالعه حاضر فرایند تمایز سلول‌های شبه قلبی از سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان انسان را در دو محیط تمایزی، در حضور گلوکز با غلظت بالا و پایین نشان داد و بین اثر دو غلظت گلوکز (۵ و ۲۵ میلی‌مولار) در تمایز کاردیومیوسیت تفاوت آماری معنی‌داری یافت نشد.

چندین پروتکل برای تمایز سلول‌های شبه کاردیومیوسیت از انواع متفاوت سلول‌ها ارایه شده است. Bohler و همکاران در سال ۲۰۰۲ پیشگام تمایز سلول‌های بنیادی رویانی به کاردیومیوسیت‌ها برروی ماتریژل در محیط حاوی MEF بودند (۱۹). Antonitsis و همکاران در سال ۲۰۰۷ از تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی در محیط حاوی ۵-آزاسیتیدین، کاردیومیوسیت بدست آوردند (۸). Lian و همکاران در سال ۲۰۱۲ کاربرد آنژیوتانسین را در تمایز صحیح سلول‌های بنیادی مزانشیمی به سلول‌های کاردیوسیت نشان دادند. آنها ثابت کردند که آنژیوتانسین و ۵-آزا سیتیدین عوامل موثری برای فرایند تمایز کاردیومیوسیت بودند؛ ضمن این که اثرشان نیز مشابه هم بود (۲۰). کدیور و همکاران در سال ۲۰۰۶ تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از بند ناف انسان به کاردیومیوسیت را در حضور ۵-آزاسیتیدین بررسی کردند (۲۱). Lian و همکاران در سال ۲۰۱۳ نشان دادند که مسیر پیام‌رسانی wnt نقش مهمی را در ایجاد کاردیومیوسیت دارای عمل از سلول‌های پلوری پوتنت انسانی بازی می‌کند (۲۲).

مشابه مطالعه قبلی ما، سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان در محیط حاوی غلظت پایین گلوکز در روز ۱۴ به صورت طبیعی به سلول‌های شبه قلبی تمایز می‌یابند. مشابه غلظت پایین گلوکز، استفاده از دوز بالای گلوکز طی تمایز، تعداد سلول‌های شبه‌کاردیومیوسیت در روز ۱۴ افزایش می‌یابد. ۵-آزا سیتیدین در هر دو دوز گلوکز به عنوان القا کننده تمایز عمل می‌کند. میزان بیان مارکرهای سلول قلبی Connexin43، α-cardiac actin، TroponinI و TroponinT در طول دوره تمایز در هر دو غلظت ۵ و ۲۵ میلی‌مولار گلوکز (در روزهای صفر، ۷، ۱۴ و ۲۱) در سطح mRNA با استفاده از تکنیک Q-PCR شناسایی شد. نتایج نشان داد که این مارکرها تا روز ۱۴ تمایز افزایش و سپس کاهش می‌یابد. Li و همکاران در سال ۲۰۰۷ اثر زمان مجاورت با گلوکز بر تکثیر سلول‌های بنیادی مزانشیمی انسان را بررسی کردند و هیچ تغییر معنی‌داری در تکثیر سلول‌های بنیادی مزانشیمی در تیمار کوتاه‌مدت با گلوکز در غلظت ۲۵ میلی‌مولار مشاهده نکردند؛ اما تکثیر سلول‌ها پس از مجاورت طولانی مدت با گلوکز در غلظت ۲۵ میلی‌مولار به‌طور معنی‌داری کاهش داشت (۲۳). Stolzing و همکاران در سال ۲۰۰۶ نشان دادند که کاهش گلوکز در محیط سلول‌های بنیادی مزانشیمی موش صحرایی منجر به افزایش تکثیر، افزایش گلوکز باعث تحریک آپوپتوز می‌شود (۱۲). Yang و همکاران در سال ۲۰۱۶ اثر گلوکز بالا بر تمایز سلول بنیادی رویانی به کاردیومیوسیت را بررسی کردند. آنها مشاهده کردند تمایز کاردیومیوسیت از سلول‌های بنیادی رویانی در شرایط گلوکز بالا سرکوب می‌شود. شاید گلوکز بالا باعث توقف بلوغ کاردیومیوسیت‌های تمایزیافته می‌شود (۱۴). تیمار سلول‌های بنیادی با گلوکز بالا منجر به تمایز استئوژنیک آنها در محیط کشت می‌شود (۲۳). Wang و همکاران در سال ۲۰۱۳ طی تمایز استئوژنیک، سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان موش کوچک آزمایشگاهی را در مجاورت محدوده‌ای از چندین غلظت گلوکز قرار دادند. آنها نشان دادند که در غلظت‌های بالای گلوکز، تکثیر سلول‌های بنیادی مشتق از مغز استخوان تحریک و تمایز استئوژنیک مهار شده است (۲۴). Balistreri و همکاران در سال ۲۰۱۷ خودتجمعی بافت سه‌بعدی قلب از سلول‌های قلبی مشتق از iPSC را در حضور غلظت بالای گلوکز مطالعه کردند. نتایج آنها ثابت کرد که تکثیر

کاردیومیوسیت‌های حاصله در سطح بالای گلوکز منجر به شکستن خودتجمعی کاردیومیوسیت‌ها بدون از دست دادن قابلیت انقباض آنها می‌شود. به عبارت دیگر سطح بالای گلوکز بر تولید ساختار میکرو بافت اثر می‌گذارد و بر انقباض خودبخود تاثیر ندارد (۲۵). Ku و همکاران در سال ۲۰۱۱ بیان TroponinI را در قلب موش های صحرایی دیابتی بررسی و مشاهده کردند که سطح بیان TroponinI در قلب موش های صحرایی دیابتی به‌طور معنی‌داری افزایش یافت (۲۶). مطابق با این نتایج، افزایش بیان تروپونینI در شرایط با گلوکز بالا در مقایسه با شرایط با گلوکز پایین، بیشتر بود. Histumoto و Shirai در سال ۲۰۱۵ نشان دادند تروپونین T در بیماران مبتلا به سندرم متابولیک بیشتر است. در حقیقت، سطح گلوکز خون در سندرم متابولیک بالا است و ممکن است منجر به افزایش بیان تروپونین T شود (۲۷). نتایج مطالعه حاضر نشان داد که طی تمایز سلول‌های شبه قلبی، تروپونین T افزایش می‌یابد که این مورد با نتایج Histumoto و Shirai (۲۷) مطابقت دارد. Sato و همکاران ثابت کردند که بیان Connexin43 به‌وسیله غلظت‌های بالای گلوکز کاهش داشت که در ادامه منجر به کاهش فعالیت gap junction در سلول‌های اندوتلیال عروق می‌شود (۲۸). در مطالعه حاضر مقایسه بیان مارکرهای قلبی طی تمایز در حضور غلظت‌های مختلف گلوکز نیز نشان دادکه میزان افزایش بیان کانکسین ۴۳ در غلظت بالای گلوکز کمتر از افزایش آن در غلظت پایین گلوکز است. علاوه بر این بیان تروپونین I و تروپونین T نیز در غلظت ۲۵ میلی‌مولار گلوکز بیشتر از میزان آن در غلظت ۵ میلی‌مولار بود. شاید یکی از علل بدون ضربان بودن کاردیومیوسیت‌های حاصل عدم تناسب در بیان مارکرهای قلبی مورد بررسی باشد. چرا که همه این مارکرها انقباضات و ضربان قلب را کنترل می‌کنند.

به‌هرحال مطابق با مطالعه ما تفاوت بین اثر غلظت ۵ و ۲۵ میلی‌مولار گلوکز بر تمایز قلبی معنی‌دار نبود. گلوکز شاید در دوزهای دیگر بر تمایز قلبی تاثیر داشته باشد که میزان غلظت آن باید نرمال و اپتیمم شود که البته اثبات این موضوع نیاز به مطالعات بیشتری دارد.

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان داد که در غلظت‌های ۵ و ۲۵ میلی‌مولار گلوکز، تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی به کاردیومیوسیت تقریباً مشابه بوده و میزان بیان مارکرهای قلبی در هر دو غلظت تفاوت آماری معنی‌داری نشان نداد. ضمن این که بررسی مجزای مارکرها در دو غلظت متفاوت گلوکز، بیانگر تفاوت بیان هر کدام از مارکرها در شرایط مختلف تمایز است.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل پایان‌نامه خانم سارا رئیس‌السادات برای اخذ درجه کارشناسی ارشد در رشته بیوتکنولوژی پزشکی از دانشکده فناوری‌های نوین دانشگاه علوم پزشکی گلستان بود. همچنین حاصل طرح تحقیقاتی (شماره ۹۴۰۳۱۰۰۴۳) مصوب معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی گلستان بود و با حمایت مالی آن معاونت به انجام رسید و بدین وسیله از آن معاونت محترم به خاطر حمایت مالی صمیمانه سپاسگزاری می‌گردد.

References

1. Braunwald E, Pfeffer MA. Ventricular enlargement and remodeling following acute myocardial infarction: mechanisms and management. Am J Cardiol. 1991 Nov; 68(14): 1D-6D. doi: 10.1016/0002-9149(91)90255-j

2. Nöth U, Osyczka AM, Tuli R, Hickok NJ, Danielson KG, Tuan RS. Multilineage mesenchymal differentiation potential of human trabecular bone-derived cells. J Orthop Res. 2002 Sep; 20(5): 1060-69. doi: 10.1016/S0736-0266(02)00018-9

3. Christoforou N, Gearhart JD. Stem cells and their potential in cell-based cardiac therapies. Prog Cardiovasc Dis. 2007 May-Jun; 49(6): 396-413. doi: 10.1016/j.pcad.2007.02.006

4. Minguell JJ, Erices A, Conget P. Mesenchymal stem cells. Exp Biol Med (Maywood). 2001 Jun; 226(6): 507-20. doi: 10.1177/153537020122600603

5. Burlacu A, Rosca AM, Maniu H, Titorencu I, Dragan E, Jinga V, et al. Promoting effect of 5-azacytidine on the myogenic differentiation of bone marrow stromal cells. Eur J Cell Biol. 2008 Mar; 87(3): 173-84. doi: 10.1016/j.ejcb.2007.09.003

6. Anversa P, Fitzpatrick D, Argani S, Capasso JM. Myocyte mitotic division in the aging mammalian rat heart. Circ Res. 1991 Oct; 69(4): 1159-64.

7. Urbanek K, Torella D, Sheikh F, De Angelis A, Nurzynska D, Silvestri F, et al. Myocardial regeneration by activation of multipotent cardiac stem cells in ischemic heart failure. Proc Natl Acad Sci USA. 2005; 102(24): 8692-97. doi: 10.1073/pnas.0500169102

8. Antonitsis P, Ioannidou-Papagiannaki E, Kaidoglou A, Papakonstantinou C. In vitro cardiomyogenic differentiation of adult human bone marrow mesenchymal stem cells. The role of 5-azacytidine. Interact Cardiovasc Thorac Surg. 2007 Oct; 6(5): 593-97. doi: 10.1510/icvts.2007.157875

9. Makino S1, 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 Mar; 103(5): 697-705. doi: 10.1172/JCI5298

10. 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 May; 58(2): 460-68. doi: 10.1016/s0008-6363(03)00265-7

11. Saki N, Jalalifar MA, Soleimani M, Hajizamani S, Rahim F. Adverse effect of high glucose concentration on stem cell therapy. Int J Hematol Oncol Stem Cell Res. 2013; 7(3): 34-40.

12. Stolzing A, Coleman N, Scutt A. Glucose-induced replicative senescence in mesenchymal stem cells. Rejuvenation Res. 2006; 9(1): 31-35. doi: 10.1089/rej.2006.9.31

13. Chang J, Li Y, Huang Y, Lam KS, Hoo RL, Wong WT, et al. Adiponectin prevents diabetic premature senescence of endothelial progenitor cells and promotes endothelial repair by suppressing the p38 MAP kinase/p16INK4A signaling pathway. Diabetes. 2010 Nov; 59(11): 2949-59. doi: 10.2337/db10-0582

14. Yang P, Chen X, Kaushal S. Reece EA, Yang P. High glucose suppresses embryonic stem cell differentiation into

cardiomyocytes. Stem Cell Res Ther. 2016; 7: 187. doi: 10.1186/s13287-016-0446-5

15. Li WJ, Guo QQ, Gharibeh L, Xu R, Chen S, Sun K. Inhibition of Cardiomyogenesis in Embryocarcinoma Cells Induced by Long-Term High Level of Glucose. Cell Physiol Biochem. 2016; 38(5): 2041-52. doi: 10.1159/000445563

16. Li WY, Song YL, Xiong CJ, Lu PQ, Xue LX, Yao CX, et al. Insulin induces proliferation and cardiac differentiation of P19CL6 cells in a dose-dependent manner. Dev Growth Differ. 2013 Sep; 55(7): 676-86. doi: 10.1111/dgd.12075

17. Nakano H, Minami I, Braas D, Pappoe H, Wu X, Sagadevan A, et al. Glucose inhibits cardiac muscle maturation through nucleotide biosynthesis. Elife. 2017 Dec; 6. pii: e29330. doi: 10.7554/eLife.29330

18. Khajeniazi S, Solati M, Yazdani Y, Soleimani M, Kianmehr A. Synergistic induction of cardiomyocyte differentiation from human bone marrow mesenchymal stem cells by interleukin 1β and 5-azacytidine. Biol Chem. 2016 Dec; 397(12): 1355-64. doi: 10.1515/hsz-2016-0151

19. Boheler KR, Czyz J, Tweedie D, Yang HT, Anisimov SV, Wobus AM. Differentiation of pluripotent embryonic stem cells into cardiomyocytes. Circ Res. 2002 Aug; 91(3): 189-201.

20. Lian X, Hsiao C, Wilson G, Zhu K, Hazeltine LB, Azarin SM, et al. Robust cardiomyocyte differentiation from human pluripotent stem cells via temporal modulation of canonical Wnt signaling. Proc Natl Acad Sci U S A. 2012 Jul; 109(27): E1848-57. doi: 10.1073/pnas.1200250109

21. Kadivar M, Khatami S, Mortazavi Y, Shokrgozar MA, Taghikhani M, Soleimani M. In vitro cardiomyogenic potential of human umbilical vein-derived mesenchymal stem cells. Biochem Biophys Res Commun. 2006 Feb; 340(2): 639-47. doi: 10.1016/j.bbrc.2005.12.047

22. Lian X, Zhang J, Azarin SM, Zhu K, Hazeltine LB, Bao X, et al. Directed cardiomyocyte differentiation from human pluripotent stem cells by modulating Wnt/β-catenin signaling under fully defined conditions. Nat Protoc. 2013 Jan; 8(1): 162-75. doi: 10.1038/nprot.2012.150

23. Li YM, Schilling T, Benisch P, Zeck S, Meissner-Weigl J, Schneider D, et al. Effects of high glucose on mesenchymal stem cell proliferation and differentiation. Biochem Biophys Res Commun. 2007 Nov; 363(1): 209-15. doi: 10.1016/j.bbrc.2007.08.161

24. Wang J, Wang B, Li Y, Wang D, Lingling E, Bai Y, Liu H. High glucose inhibits osteogenic differentiation through the BMP signaling pathway in bone mesenchymal stem cells in mice. EXCLI J. 2013 Jun; 12: 584-97.

25. Balistreri M, Davis JA, Campbell KF, Da Rocha AM, Treadwell MC, Herron TJ. Effect of Glucose on 3D Cardiac Microtissues Derived from Human Induced Pluripotent Stem Cells. Pediatr Cardiol. 2017 Dec; 38(8): 1575-82. doi: 10.1007/s00246-017-1698-2

26. Ku PM, Chen LJ, Liang JR, Cheng KC, Li YX, Cheng JT. Molecular role of GATA binding protein 4 (GATA-4) in hyperglycemia-induced reduction of cardiac contractility. Cardiovasc Diabetol. 2011 Jun; 10: 57. doi: 10.1186/1475-2840-10-57

27. Hitsumoto T, Shirai K. Factors affecting high-sensitivity cardiac troponin T elevation in Japanese metabolic syndrome patients. Diabetes Metab Syndr Obes. 2015 Mar; 8: 157-62. doi: 10.2147/DMSO.S80907

28. Sato T, Haimovici R, Kao R, Li AF, Roy S. Downregulation of connexin 43 expression by high glucose reduces gap junction activity in microvascular endothelial cells. Diabetes. 2002 May; 51(5): 1565-71. doi: 10.2337/diabetes.51.5.1565