مقایسه روش‌های کشت، فرآوری و بهبود روش‌های تمایزی سلول‌های بنیادی به کاردیومیوسیت

• **دکتر عبدالرضا اسماعیل زاده**
دانشیار، گروه ایمونولوژی دانشکده پزشکی و مرکز تحقیقات ژن درمانی سرطان دانشگاه علوم پزشکی زنجان، ایران

• **ناهید دانشی**
دانشجوی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زنجان، ایران

• **مریم عرفان منش**
کارشناس ارشد بیوتکنولوژی، آزمایشگاه تخصصی بیمارستان بهمن، زنجان، ایران

چکیده

سابقه و هدف: در حال حاضر اولین عامل مرگ و میر در جهان بیماری‌های قلبی عروقی است که سالانه جان میلیون‌ها نفر را در جهان می‌گیرد. سلول‌های قلبی سلول‌های تمایز یافته هستند و توانایی تکثیر و ترمیم قلب آسیب‌دیده را ندارند. روش‌های مختلفی برای بهبود وضعیت بیماران قلبی وجود دارد. یکی از روش‌های جدید ترمیم و باز ساخت عضله قلب با استفاده از سلول‌های بنیادی است. برای این کار از منابع سلولی مختلفی استفاده می‌شود.

روش جست و جو: مطالعه حاضر یک مطالعه مروری است که اطلاعات آن از پایگاه‌های اطلاعاتی Pub Med، SID، Google scholar و Science direct در بازه زمانی ۲۰۰۰ تا ۲۰۱۵ به دست آمده است. داده‌ها با استفاده از کلمات کلیدی سلول‌های بنیادی، مسیر wnt، کاردیومیوسیت، انفارکتوس قلبی و سلول درمانی جستجو شده است.

نتایج و یافته ها: برای پیوند سلولی در عضله قلب سلول‌های مختلفی از جمله سلول‌های جنینی، سلول‌های سوماتیکی و سلول‌های چند ظرفیتی القایی به کار می‌روند که تفاوت‌هایی از نظر ایمنی، تومورزایی، بیان ژن ها، روش‌های مورد استفاده و ... دارند. برای تمایز سلول‌های بنیادی به کاردیومیوسیت از روش‌های مختلفی مانند همکشتی، استفاده از القاگرهای شیمیایی، تنظیم مسیرهای کنترل رشد و تمایز مانند wnt و ... استفاده می‌شود. با توجه به منبع سلولی و روش کشت مورد استفاده، تمایز سلول‌های مختلف به کاردیومیوسیت کارایی و اثر بخشی متفاوتی را نشان می‌دهد. در این مقاله نگاهی اجمالی به روش‌های فرآوری، کشت و تمایز سلول‌ها به کاردیومیوسیت شده است.

بحث و نتیجه گیری: سلول‌های مزانشیمی مشتق از غشای آمنیوتیک، سلول‌های امن و بی خطری برای کلینیک به حساب می‌آیند که موجب بهبود عملکرد قلب مبتلا به انفارکتوس می‌شوند. برای افزایش درصد تمایز سلول‌های بنیادی به کاردیومیوسیت تنظیم مسیرهای رشد و تمایز مانند wnt روش مناسبی است و موجب ایجاد ۹۸ درصد کاردیومیوسیت می‌شود.

کلمات کلیدی: سلول‌های بنیادی، مسیر wnt، کاردیومیوسیت، انفارکتوس قلبی، سلول درمانی

مقدمه

بیماری‌های قلبی عروقی اصلی ترین عامل مرگ و میر در ایالات متحده آمریکا و ایران است و سالانه سی درصد کل مرگ و میرها را شامل می‌شود. این بیماری‌ها مرگ و میر، ناتوانی و مشکلات اجتماعی زیادی به همراه دارد و هزینه‌های سنگینی به بیماران تحمیل می‌کند (۱).

مـرگ و میـر در اثر بیماری‌هـای قلبـی عروقی در کشور های در حال توسعه و توسعه نیافته رو به افزایش اسـت و به بیش از چهل درصد در سـال ۲۰۲۰ خواهد رسید. سن شروع بیماری‌های قلبی عروقی کاهش یافته است و درصد زیادی از مبتلایان به این بیماری ها کمتر از ٦٠ سال سن دارند (۲).

برخی از بیماری‌های قلبـی عروقی مانند انفارکتوس میوکـارد باعـث فیبـروزه شـدن ناحیـه انفارکتـه و تشـکیل اسکـار می‌شـود. در نتیجه قـدرت انقباضی و بـرون ده قلبـی کاهـش می‌یابـد. سلول‌هـای قلبی انسـان بعد از تولـد توانایـی تکثیر خـود را از دست می‌دهـد و توانایی بازسـازی و ترمیـم میوکارد آسیب دیده را ندارد (۳).

روش‌های درمانی مختلفـی برای این بیماران وجود دارد. درمـان مراحل انتهایی بیماری‌هـای قلبی، پیوند قلب است. بـا این وجود هزینه‌های زیـاد، استفاده از داروهای سرکوبگر ایمنی و کمبود دهنده عضو، استفاده از آن را محدود می‌کنـد. آخرین روش درمانی توصیه شده انتقال سلول‌های بنیادی به عضله قلب آسیب دیده است که تحت شـرایط خاص باعث افزایش آنژیوژنز و تولیـد سلول‌های جدید قلبـی در ناحیه آسیب دیده می‌شود (٤).

برای پیوند سلولی در عضله قلب از سلول‌های مختلفی از جمله سلول‌های جنینی، سلول‌های سوماتیکی و سلول‌های چند ظرفیتی القایی استفاده شـده است کـه هر کدام مزایا و معایـب خاص خـود را دارند. در این مقاله سعی شـده است عـلاوه بر ذکر روش‌های مختلف مورد استفاده، مزایا و معایـب تمایز انواع مختلف سلول‌هـا به کاردیومیوسیت بیان شـده و در انتها یک منبع سلولی مناسب برای کارهای کلینیکـی و روش جدیـد بـرای افزایش درصـد تمایزی کاردیومیوسیت معرفی گردد.

روش مطالعه

مطالعه حاضر یک مطالعه مروری است که اطلاعات آن از پایگاه‌هـای اطلاعاتی Pub Med، Google scholar SID و Science direct در بـازه زمانی ۲۰۰۰ تا ۲۰۱۵ بـه دست آمده اسـت. داده‌ها با استفـاده از کلمات کلیدی سلول‌های بنیادی، مسیر wnt، کاردیومیوسیت، انفارکتوس قلبی و سلول درمانی جستجو شده است.

انـواع سلول‌های مورد مطالعه: این مطالعه عمدتا بر روی سه گروه اصلی سلولی به ترتیب زیر انجام شده است.

۱) سـلول‌های بنیادی جنینـی[1](ESCs): سلول‌هایی با منشا جنینی هستند که برای اولین بار از لایه سلولی داخلی بلاستوسیت موش بدست آمدنـد. این سلول‌ها به صورت تمایز نیافته قدرت تقسـیم زیادی داشته و می‌توانند به انواع مختلف سلول‌ها از جمله کاردیومیوسیت تمایز یابند (۵).

۲) سلول‌های بنیادی سوماتیکی: از سلول‌های سوماتیکی (سلول‌های بنیـادی اختصاصی بافت و یا بالغین هم نامیده می‌شـود) می‌توان به پروژنیتور سل‌هـا مانند EPCs[2] (٦) و سلول‌های بنیادی مزانشـیمی (MSCs)[3] (۷) اشاره کرد. سلول‌هـای بنیادی مزانشـیمی از منابع مختلفـی مانند مغز استخوان، غشای آمنیوتیک، خون قاعدگی و خون بند ناف بدست می‌آیند (۷). این سلول‌ها توانایی خود را برای تمایز به انواع سلول‌ها حفـظ کرده و موجب بازسازی استخوان، غضروف، ماهیچه و بافت چربی می‌شوند (۸).

۳) سـلول‌های چنـد ظرفیتـی القایـی(IPSCs)[4] : یاماناکـا(Yamanaka) و همکاران نشـان دادند که افزایش بیان چهار فاکتور رونویسـی Oct-4، Sox2، Klf-4، c-Myc سلول‌هـای سوماتیکی را بـه iPSC تغییر می‌دهد (۹). انواع سلول‌های سوماتیکی مانند سلول‌های تک هسـته‌ای خون و سلول‌هـای پوستی از نظر ژنتیکی برنامـه ریزی مجدد انجام می‌دهند و یک وضعیت شـبه سلول‌های بنیادی جنینی ایجاد می‌کنند که می‌تواند به انواع مختلف سلول‌ها تمایز یابد (۱۰).

1- Embryonic Stem Cells
2- Endothelial Progenitor Cells
3- Mesenchymal Stem Cells
4- Induced pluripotent Stem Cells

در جدول شماره ۱ ویژگی‌های انواع مختلف سلول‌ها و تمایز آن‌ها به کاردیومیوسیت مقایسه شده است.

جدول شماره ۱. مقایسه انواع سلول‌های مورد استفاده در درمان نارسایی قلبی

نام محقق	سال	منبع سلولی	درصد تمایز	القای تمایز قلبی با:	ژن‌ها و پروتئین‌های قلبی	آزمایش in vivo
Kehat et al	2001	ESCs	29%	کشت در سوسپانسیون و تشکیل EB	Nkx2.5،GATA4 cTnI(cardiac troponin I), cTnT ANP(Atrial Natriuretic Peptide) mlc-2v(myosin light chain 2v) mlc-2a αMHC(α-Myosin Heavy Chain)	
Ye et al	2013	UCBips7[1]	88%	Activin-A/BMP-4 / VEGF protocol	GATA4،Nkx2.5 αsarcomere، mlc-2v ،cTnI actin cTnT	
		PCBC16ips[2]	59%			
Sanchez-Freire et al	2014	CPCs[3]	46%*	Embryoid body and monolayer-based differentiation protocols	NKX2-5, MESP1, ISL1, HAND2 MYOCD, MEF2C, GATA4	منطقه انفارکتوس 42%→21%
			57%**			
		Fibroblast	34%*			42%→27%
			51%**			
Tsuji et al	2010	hAMCs[4]	33%	همکشتی با کاردیومیوسیت جنین موش	تمام ژن‌های خاص قلبی بیان شد	فیبروز میوکارد 18%→13% Fractional shortening 34%→39%
Antonitsis et al	2007	hBMMSCs[5]		تیمار با 5-azacytidin	βMHC cardiac troponin T αcardiac actin ،vimentin	
Badorff et al	2003	EPCs	10%	همکشتی با کاردیومیوسیت موش	α-sarcomeric actinin cTnI, ANP myocyte enhancer factor2 (MEF-2)	بهتر شدن رگزایی و عملکرد قلب
Motamedi et al	2010	hMSC		تیمار با اکسی توسین	αMHC، OTR، mlc2v α-3actinin troponin IC GATA4 عدم بیان	

* درصد سلول‌های **cTnT** مثبت در کاردیومیوسیت‌های حاصل از **EBs protocol**

** درصد سلول‌های **cTnT** مثبت در کاردیومیوسیت‌های حاصل از **monolayer-based protocol**

1- Reprogrammed from Human Umbilical Cord Mononuclear Blood Cells
2- Reprogrammed from Neonatal Human Dermal Fibroblast
3- Cardiac Progenitor Cells
4- Human Amniotic Membrane–derived Mesenchymal Cells
5- Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells

یافته ها

روش‌های مختلف تمایز کاردیومیوسیت از سلول‌های بنیادی

تزریق مستقیم سلول‌های بنیادی مزانشیمی به محل آسیب مزمن ناشی از انفارکتوس میوکارد (chronic MI scare) موجب بهبود عملکرد بطنی می‌شود (۱۱). سلول‌های مورد استفاده در درمان انفارکتوس قلبی سلول‌هایی تمایز نیافته هستند که می‌توانند به انواع مختلف سلول‌ها تمایز یابند. در نتیجه احتمال دارد تعداد کمی از سلول‌های پیوندی به کاردیومیوسیت تمایز یابند. بنابراین تمایز مستقیم سلول‌های بنیادی به رده کاردیومیوسیت قبل از پیوند می‌تواند برای افزایش بازده سلول درمانی مناسب باشد (۱۲). محققان بیان داشته اند که cyclic strain (۱۳)، محیط حاصل از بافت ایسکمیک قلبی (۱٤) و همکشتی با کاردیومیوسیت موش (۱۵) موجب افزایش تمایز MSCs به کاردیومیوسیت می‌شود.همچنین هاتزیسترگوز(Hatzistergos) و همکاران نشان دادند که تزریق MSCs به قلب انفارکته موجب تحریک سلول‌های بنیادی قلبی میزبان و تمایز آن‌ها به کاردیومیوسیت بالغ می‌شود. آن‌ها این روش را به عنوان مکانیسم سلول درمانی در بهبود عملکرد قلبی معرفی کردند (۱٦). کهات (Kehat) و همکاران با کشت سلول‌های بنیادی جنینی در سوسپانسیون و تشکیل EB (Embryoid Body)این سلول‌ها را به کاردیومیوسیت تمایز دادند (۵). یه (Ye) و همکاران برای تمایز iPSCاز ترکیب ActivinA/BMP4/VEGFاستفاده کردند (۱۰). محققان برای تمایز سلول‌های بنیادی به کاردیومیوسیت از القاگرهای شیمیایی مختلفی استفاده می‌کنند.5-azacytidin رایج‌ترین القاگر شیمیایی است که برای تمایز کاردیومیوسیت از MSCs استفاده می‌شود. 5-AZA به عنوان آنالوگ شیمیایی cytidine در نظر گرفته می‌شود که خاصیت دمتیلاسیون DNA دارد (۱۱). این ماده جلوی تکثیر سلولی را گرفته و آپاپتوز را از طریق فعال کردن P53-P21 القا می‌کند (۱۷). اما کاستی‌های5-AZA ، استفاده از آن را برای کارهای کلینیکی با سوالاتی مواجه می‌کند.

یکی از دلایل بزرگ، پتانسیل آن برای جلوگیری از متیلاسیون DNA توسط شکل گیریDNA- methyltransferase است. 5-AZA با دمتیلاسیون ۵- متیل سیتوزین فعالیت متیل ترانسفرازی را در سلول کاهش می‌دهد.5- AZA عدم تعادل ایجاد کرده و سازماندهی کروماتین را تحت تاثیر قرار می‌دهد. در نتیجه این سلول‌های دستکاری شده برای کارآزمایی‌های بالینی زیاد مناسب نیستند (۱۲). به دلیل اثرات منفی 5-AZA، کاهش قابلیت استفاده در بالین و همچنین کم بودن درصد تمایزی کاردیومیوسیت حاصل پژوهشگران سعی کرده‌اند القاگرهای جدیدی مانند

TGFβ1 (12)،angiotensinII (angII) (18)
cardiotrophin1 (19) ، Slingshot-1L (ssh1L)(20)
Suberoylanilide Hydroxamic Acid (SAHA) (21)
1.25-vitamin-D3 (22) و

معرفی کنند. گائو (Gao) و همکاران از ترکیب جدیدی برای تمایز کاردیومیوسیت استفاده کردند. آن‌ها به همراه 5-AZA از salvianolic acid B (salB) و Cardiomyocytes Lysis Medium (CLM) نیز استفاده کردند. در این آزمایش، سلول‌ها با به کارگیری لنتی ویروس β-catenin را بیان نکردند. مهار Wnt و استفاده از 5-AZA یک نقش تحریکی در تمایز کاردیومیوسیت از MSC دارد. CLM یکparacrine microenvironment برای تمایز کاردیومیوسیت فراهم می‌کند.

نتایج نشان داد که با استفاده از این روش درصد تمایزی و مقدار بیان ژن‌های خاص قلبی افزایش می یابد (بدون انقباض خود به خودی) (۱۱). یان (Yan) و همکاران با مهار مسیر P53-P21 توسط P.fifty three inhibitor-α (PFTα) آپاپتوز را کاهش داده و BMMSC را برای تمایز به سلول‌های شبه کاردیومیوسیت القا کردند. با استفاده همزمان از این ماده و 5-AZA بیشترین تمایز حاصل شد (۱۷). فنگ (Feng) و همکاران نشان دادند که suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA) القاگر قوی تر از 5-AZA برای تمایز کاردیومیوسیت از MSC است و هیچ اثر سینرژیک یا آنتاگونیست بین این ماده و 5-AZA در تمایز کاردیومیوسیت وجود ندارد.

SAHA مهارکننده هیستون داستیلاز است. آن‌ها بیان کردند که استیلاسیون هیستون مکانیسم تعیین کننده تمایز کاردیومیوسیت از MSCs است (۲۱).

انواع القاگرهای شیمیایی مورد استفاده برای تمایز سلول‌های بنیادی به کاردیومیوسیت در جدول شماره ۲ مقایسه شده‌اند.

جدول شماره ۲. مقایسه انواع عوامل محرک در کشت سلول برای تمایز سلول‌های کاردیومیوسیت و نتایج آن

محقق	سال	محرک	سلول	بازده	جمعیت انقباضی
Mohanty et al	2013	TGFB1	hBMMSC	کمتر از 5-AZA	منفی
Xing et al	2012	Ang II	rBMMSC	تقریبا برابر 5-AZA	
		AngII+5-AZA		بیشتر از 5-AZA (کاهش زمان تمایز به سه هفته)	
Gao et al	2014	5-AZA+salB+CLM	rBMMSC	بیشتر از هر یک به تنهایی	منفی
Hatzistergos et al	2010	BMMSC	CSC[1]	افزایش تکثیر و تمایز CSC به کاردیومیوسیت کاهش اسکار قلبی از ۲۵٪ به ۱۰٪ (بعد از ۸ هفته)	
Yan et al	2011	PFTα	rBMMSC	بیشتر از 5-AZA	
Huang et al	2012	Cyclic strain	rMSC	تمایز کاردیومیوسیت از MSC	
		Cyclic strain+5-AZA		افزایش سطح مارکرهای قلبی	
Xinyun et al	2010	Cardiotrophin 1(Ct1)	rBMMSC	افزایش بیان ژن‌ها و پروتئین ها	تعداد کمی از سلول‌ها منقبض شدند
		Ct1+5-AZA		افزایش تمایز و بلوغ کاردیومیوسیت از MSCs	
Ramesh et al	2012	شرایط ایسکمی قلبی	hMSC	تمایز کاردیومیوسیت متناسب با مراحل اولیه کاردیوژنز	
Zhao et al	2012	SSH1L	hBMMSC	افزایش بیان ژن‌ها و پروتئین قلبی گسترش تمایز کاردیومیوسیت از MSCs	
Feng et al	2009	SAHA	rMSC	افزایش بیان ژن‌ها و پروتئین قلبی القاگر قویتر از 5-AZA بیان MHC افزایش نیافت	
Feng et al	2009	کاردیومیوسیت	rBMMSC	القای تمایز کاردیومیوسیت از طریق co-culture	
Hlaing et al	2014	1.25-vitamin-D3	H9c2 rat embryonic myocardium cell	تنظیم مهاری canonical Wnt signaling تنظیم مثبت (افزایشی) بیان Wnt11	

1- Cardiac Stem Cell

روش‌هـای متنوعی بـرای افزایش درصـد تمایزی منابع سلولـی مختلف بـه کاردیومیوسیت وجـود دارد. یکی از این روش‌ها تنظیـم Wnt signalingاست. فعال شـدن canonical Wnt ماننـد Wnt3a،Wnt2a،Wnt1و Wnt8a تمایـز قلبـی در ESC را مهـار می‌کند. در حالی کـه فعـال شـدن non canonical wnt مانند Wnt4، Wnt5aو Wnt11کاردیوژنـز را افزایـش می‌دهد (۲۳). لیـان (Lian)و همکاران توانسـتند بدون فاکتور رشـد یا سـرم، تنهـا از طریـق تنظیـم Wnt signaling درصد تمایزی کاردیومیوسیت را تا ۹۸٪ افزایش دهند. آن‌ها نشان دادند که تیمار hPSC بـا مهار کننده گلیکوژن سنتاز کیناز 3(GSK3)[1] و به دنبال آن القاء بیان β-catenin shRNA و یا قرار گرفتن در معرض مهار کننده‌های شیمیایی تولیدات Wnt signaling می‌توانـد محصـول کاردیومیوسیـت حاصل را تا ۹۸٪ افزایش دهد (۲٤). مهار Wnt signaling بـرای خـود تجدید شـوندگی سلول‌های مزانشـیمی مهم اسـت. ساراسواتی (Saraswati) و همکاران نشـان دادند کـه Pyrvinium (مهـار کننـده Wnt signaling) تکثیـر MSC را افزایش می‌دهد. در حالـی که تمایز آن به استخـوان و غضروف را کم می‌کند. همچنین پیوند طولانی مدت سلول‌های بنیادی مزانشـیمی را نیـز ممکن می‌سازد (۲۵). هدایـت Wnt11، تمایز BMMSCs را به فنوتیپ قلبـی افزایش می‌دهد. سایـز منطقه انفارکتـوس و آپاپتوز کاردیومیوسیت داخل بافت حیوانی که MSC^{wnt11} دریافت کرده بودند کاهش یافت. پیوند MSC^{Wnt11} عملکرد قلب را بهبود بخشید (۲۳). استفاده از مهارکننده GSK3و محصولات Wntبـرای تمایز کاردیومیوسیـت از ESC و iPSC موثر اسـت، اما کانـل (Connell) و همکاران نشـان دادند که تنظیـم Wnt signalingبر اسـاس مولکول‌های کوچک تنظیمی بـه تنهایی برای ایجاد کاردیومیوسیت عملکردی از AFSC (Amniotic Fluid-derived Stem Cell) کافی نیسـت، گرچـه ژن‌ها و پروتئین‌هـای رایج رده قلبی بیشـتر بیان می‌شود (۲٦). شـارما (Sharma) و همکاران برای خالص سازی کاردیومیوسیت، بعد از القای تمایز قلبی از طریق مولکول‌های کوچک تنظیمی، از روش Glucose Starvation استفاده کردنـد (۲۷). انواع روش‌های مورد استفاده برای تنظیم مسـیر wnt در جدول شماره ۳ مقایسه شده‌اند.

جدول شماره ۳. مقایسه انواع تنظیم کننده‌های wnt، برای افزایش درصد تمایز سلول‌های بنیادی به کاردیومیوسیت

محقق	سال	سلول	محرک	نتایج
Connell et al	2015	AFSC	تنظیم مولکولی wnt signaling توسط CH و IWP	عدم تشکیل functional cardiomyocyte
Kadari et al	2015	hiPSC	تنظیم Wntو BMP + غنی سازی با لاکتات	درصد تمایزی در ۱۵روز به ۹۵% رسید
Zuo et al	2012	rBMMSC	Transduction of wnt 11	↑ تمایز به فنوتیپ قلبی ↓ منطقه انفارکتوس و آپاپتوز در حیوانات آزمایشگاهی
Saraswati et al	2012	MSC	Wnt inhibitor (pyrvinium)	تکثیر ↑ MSC ↓ خاصیت استئوژنز و کندروژنز ↓β-catenin سیتوپلاسم
Lian et al	2012	hiPSC	تنظیم wnt با تغییر ژنتیکی	cTnT+ 98%
			تنظیم wnt با مولکول کوچک تنظیمی	cTnT+ 87%
Sharma et al	2015	hiPSC	تنظیم wnt به وسیله مولکول‌های کوچک تنظیمی+ غنی سازی با glucose starvation	۳۰٪ افزایش در نسبت سلول‌های کاردیومیوسیتی به غیر سلول‌های کاردیومیوسیتی در جمعیت سلول‌های تمایز یافته

1- Glycogen Synthase Kinase 3 inhibitors

بحث

ترمیم سلولی عضله قلب یک روش درمانی جدید برای بیماران قلبی است. استفاده از این روش در کلینیک نیازمند غلبه بر چندین مشکل مهم است. اولا نیازمند یک منبع سلولی غنی است که به راحتی و فراوانی در دسترس بوده و مشکلات اخلاقی نداشته باشد. ثانیا بتوان آن را به عضله قلب بیمار انتقال داد. پس لازم است که این سلول درصد تمایزی بالایی به کاردیومیوسیت نشان دهد، خاصیت تومورزایی نداشته باشد و موجب واکنش ایمونولوژیک در بدن بیمار نشود و در انتها بتواند عملکرد قلب آسیب دیده را بهبود بخشد.

با توجه به یافته‌ها از بین منابع سلولی مختلف سلول‌های iPSCs درصد تمایزی بالاتری دارند. بطوریکه یه (Ye) و همکاران درصد تمایزی UCBips7 به کاردیومیوسیت را ۸۸ درصد و درصد تمایزی PCBCips16 به کاردیومیوسیت را ۵۹ درصد گزارش کردند (۱۰). این در حالی است که کهات (Kehat) و همکاران درصد تمایزی سلول‌های جنینی به کاردیومیوسیت را ۲۹ درصد گزارش کردند (۵). سلول‌های iPSCs از بافت‌های سوماتیکی مختلف بدست می‌آیند و مشکلات اخلاقی و نگرانی‌های ایمونولوژیک ESCs را ندارند (۲۸). این سلول‌ها در پیوند autograft بدون نیاز به داروهای سرکوبگر ایمنی استفاده می‌شوند. شکل گیری نئوپلاسم مشکل اساسی این سلول‌ها است که استفاده از آن‌ها را در کلینیک محدود می‌کند (۷). از آنجاییکه سلول‌های مزانشیمی مشکل تومورزایی ندارند، سلول‌های مطمئنی در کلینیک به حساب می‌آیند. ولی در صورت استفاده برای پیوند Allograft مشکل رد ایمنی خواهند داشت. اما سلول‌های hAMCs در پیوند Xenograft نیز مشکل رد ایمنی نداشتند و در قلب موش آزمایشگاهی تا ۸۰ روز بدون نیاز به داروهای سرکوبگر ایمنی قادر به بقا بودند. با تزریق hAMCs به قلب آسیب دیده، فیبروز میوکارد از ۱۸ درصد به ۱۳ درصد کاهش یافت. درصد تمایز hAMCs به کاردیومیوسیت ۳۳ درصد گزارش شد (۷).

شن (Shen) و همکاران ضمن تقسیم روش‌های تمایز کاردیومیسیت از BMMSCs به سه دسته القاء بیوشیمیایی (Biochemistry Induction)، القاء ریز محیط میوکاردیال (Myocardial Microenvironment Induction) و مدیفیکیشن ژنتیکی (Genetic Modification) بیان کردند که همکشتی با سلول‌های میوکاردیوم و CLM روش مناسب‌تری برای تمایز کاردیومیوسیت از سلول‌های مزانشیمی است و استفاده از القاگرهای شیمیایی به علت اثرات توکسیک بر روی سلول‌های سالم مناسب نیست (۲۹). همکشتی به علت بازده کم و دست و پا گیر بودن، کمتر در کلینیک استفاده می‌شود (۱۲). محققان سعی کرده اند القاگرهای جدیدی معرفی کنند که اثرات مضرر کمتری داشته باشد یا با استفاده از یک ماده دیگر اثرات مضرر القاگر را خنثی کنند. به عنوان مثال TSA (trichostatin A)و SAHA هر دو مهار کننده هیستون داستیلاز هستند و اثر مثبت در تمایز کاردیومیوسیت دارند. SAHA در مقایسه با TSA اثر توکسیک کمتری روی سلول‌های سالم دارد و دوز بیشتری از آن را می‌توان استفاده کرد (۲۱). SAHA اگر چه درصد تمایز کاردیومیوسیت از MSC را در محیط آزمایشگاهی افزایش می‌دهد ولی روی بهبود عملکرد قلب آسیب دیده در in vivo تاثیری ندارد (۳۰). Salvianolic Acid B مورد استفاده توسط گائو(Gao) و همکارانش از فاکتورهای مضر و سمی 5-AZA محافظت می‌کند (۱۱). cardiotrophin سیتوکاینی است که بقا کاردیومیوسیت را افزایش می‌دهد و اثر ضد آپاپتوزی دارد. ممکن است در خنثی کردن اثرات سمی 5-AZA موثر باشد (۱۹).

محققان دریافته اند که مهارکننده‌های خارج سلولی BMP، Wnt و Nodal القاگر اصلی در تمایز کاردیومیوسیت به ماهیت سلول‌های قلبی هستند (۱۱). لیان (Lian) و همکاران با فعال کردن canonical Wnt در مراحل اولیه و سپس با مهار آن در مراحل بعدی توانستند درصد تمایزی iPS به کاردیومیوسیت را تا ۹۸٪ افزایش دهند (۲٤). که با توجه به غنی سازی و مادولاسیون BMP قابل توجیه است. کاداری (Kadari) وهمکاران با مادولاسیون BMP و تنظیم Wnt signalingو غنی سازی با لاکتات توانستند درصد تمایز کاردیومیوسیت را از iPS افزایش دهند. حاصل کار آن‌ها تمایز کاردیومیوسیت در ۱۵ روز با بازده ۹۵٪ بود (۹). تنظیم مسیرهای کنترل تمایز کاردیومیوسیت از طریق تغییر شکل ژنتیکی برای کلینیک مناسب نیست (۲٤). به همین دلیل محققان مهار کننده‌های شیمیایی Wnt مانند Pyrvinium(۲۵) را برای تمایز کاردیومیوسیت به کار برده‌اند. برای افزایش خلوص کاردیومیوسیت در جمعیت سلولی تمایز یافته می‌توان از

تفاوت متابولیکی موجود بین سلول‌های کاردیومیوسیتی و غیر کاردیومیوسیتی استفاده کرد، به طوری که شـارما (Sharma) و همکاران با روش glucose starvation توانسـتند نسبت سلول‌هـای کاردیومیوسیتی به غیر سلول‌هـای کاردیومیوسیتی در جمعیـت سلول‌های تمایز یافته را بـه بیش از ۳۰٪ افزایش دهنـد(۲۷). همچنان که کاداری(Kadari) و همکاران در مقاله خـود ذکر کردند کـه استفاده از القاگر خارجـی به همراه غنی سازی متابولیکی موجب افزایش درصد تمایزی می‌شود (۹).

نتیجه گیری

با توجـه به نوع نارسایی قلبی و هـدف مطالعه، بکارگیری محیط کشـت سلولی بـا محرک‌های خـاص، در زمان و دوز خـاص ضروری اسـت. یافته نشـان می‌دهد کـه سلول‌های مزانشـیمی مشتق از غشای آمنیوتیک از نظر رد ایمنی و ایجاد تومور بی خطر بوده و به راحتی و فراوانی در دسترس هستند و توانسـتند عملکرد قلب آسیب دیده را بهبود بخشند. اما این سلول‌ها درصد تمایزی پایینی (۳۳٪) نشـان دادند که مشـکل اساسی این سلول‌ها است. اگر بتوان درصد تمایزی سلول‌های مزانشیمی مشتق از غشـای آمنیوتیک را بدون تغییر ویژگی‌ها (عدم تومور زایی و القای ایمنی) افزایش داد، یک منبع سلولی مناسـب برای بهبود عملکرد قلـب و امیدی تازه برای بیماران قلبی خواهد بود. همچنین به نظر می‌رسد تنظیم مسـیر Wnt بـا مولکول‌های کوچک تنظیمـی روش مناسبی برای افزایش درصـد تمایز کاردیومیوسیت از سلول‌هـای بنیادی است. هر چنـد این روش مشـکلاتی دارد کـه باید بـر آن غلبه کرد از جملـه یافتـن مولکول‌های تنظیمـی موثر و بـی خطر که در کارآزمایی‌هـای بالینی موثر، با راهنماهـای بالینی سازگاز و از نظر اخلاقی موردی نداشته باشد.

References

1- Shamsi A, Ebadi A. Risk Factors of Cardiovascular Diseases in Elderly People. Iranian Journal of Critical of Care Nursing. 2011;3(4):187-92.

۲- صراف زادگان ن. کاهش سن بروز بیماری های قلبی- عروقی در جهان. مجله تحقیقات علوم پزشکی زاهدان ۱۳۹۰.

3- Motamedi R, Azadbakht M, Fathi F, Amini A, Ghaidari MI, Salehi E. In Vitro Differentiation of Human Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells into Cardiomyocyte-like Cells. Yakhteh Medical Journal. 2010;12(3):387-94.

4- Hojjat M, Dastpak M. Stem cells roll in heart disease treatment. Iranian Journal of Critical of Care Nursing. 2010;2(4):161-6.

5- Kehat I, Kenyagin-Karsenti D, Snir M, Segev H, Amit M, Gepstein A, et al. Human embryonic stem cells can differentiate into myocytes with structural and functional properties of cardiomyocytes. Journal of Clinical Investigation. 2001;108(3):407-14.

6- Badorff C, Brandes RP, Popp R, Rupp S, Urbich C, Aicher A, et al. Transdifferentiation of Blood-Derived Human Adult Endothelial Progenitor Cells Into Functionally Active Cardiomyocytes. Circulation. 2003;107(7):1024-32.

7- Tsuji H, Miyoshi S, Ikegami Y, Hida N, Asada H, Togashi I, et al. Xenografted human amniotic membrane-derived mesenchymal stem cells are immunologically tolerated and transdifferentiated into cardiomyocytes. Circulation research. 2010;106(10):1613-23.

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. Interactive cardiovascular and thoracic surgery. 2007;6(5):593-7.

9- Kadari A, Mekala S, Wagner N, Malan D, Koth J, Doll K, et al. Robust Generation of Cardiomyocytes from Human iPS Cells Requires Precise Modulation of BMP and WNT Signaling. Stem cell reviews. 2015;11(4):560-9.

10- Ye L, Zhang S, Greder L, Dutton J, Keirstead SA, Lepley M, et al. Effective cardiac myocyte differentiation of human induced pluripotent stem cells requires VEGF. PloS one. 2013;8(1):e53764.

11- Gao Q, Hu X, Jiang X, Guo M, Ji H, Wang Y, et al. Cardiomyocyte-like cells differentiation from non beta-catenin expression mesenchymal stem cells. Cytotechnology. 2014;66(4):575-84.

12- Mohanty S, Bose S, Jain KG, Bhargava B, Airan B. TGFbeta1 contributes to cardiomyogenic-like differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells. International journal of cardiology. 2013;163(1):93-9.

13- Huang Y, Zheng L, Gong X, Jia X, Song W, Liu M, et al. Effect of Cyclic Strain on Cardiomyogenic Differentiation of Rat Bone Marrow Derived Mesenchymal Stem Cells. PloS one. 2012;7(12):e34960.

14- Ramesh B, Bishi DK, Rallapalli S, Arumugam S, Cherian KM, Guhathakurta S. Ischemic cardiac tissue conditioned media induced differentiation of human mesenchymal stem cells into early stage cardiomyocytes. Cytotechnology. 2012;64(5):563-75.

15- Feng M, Sun R-q, Ma A-q. Study of inducing differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells of rat into cardiac myocytes in vitro. PMID. 2009;21(6):340-2.

16- Hatzistergos KE, Quevedo H, Oskouei BN, Hu Q, Feigenbaum GS, Margitich IS, et al. Bone marrow mesenchymal stem cells stimulate cardiac stem cell proliferation and differentiation. Circulation research. 2010;107(7):913-22.

17- Yan X, Lv A, Xing Y, Liu B, Hou J, Huang W, et al. Inhibition of p53-p21 pathway promotes the differentiation of rat bone marrow mesenchymal stem cells into cardiomyocytes. Molecular and cellular biochemistry. 2011;354(1-2):21-8.

18- 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. Molecular and cellular biochemistry. 2012;360(1-2):279-87.

19- Xinyun C, Zhi Z, Bin Z, Li R, Yucheng C, Yafei Y, et al. Effects of cardiotrophin-1 on differentiation and maturation of rat bone marrow mesenchymal stem cells induced with 5-azacytidine in vitro. International journal of cardiology. 2010;143(2):171-7.

20- Zhao JW, Zhang MR, Ji QY, Xing FJ, Meng LJ, Wang Y. The role of slingshot-1L (SSH1L) in the differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells into cardiomyocyte-like cells. Molecules. 2012;17(12):14975-94.

21- Feng C, Zhu J, Zhao L, Lu T, Zhang W, Liu Z, et al. Suberoylanilide hydroxamic acid promotes cardiomyocyte differentiation of rat mesenchymal stem cells. Experimental cell research. 2009;315(17):3044-51.

22- Hlaing SM, Garcia LA, Contreras JR, Norris KC, Ferrini MG, Artaza JN. 1,25-Vitamin D3 promotes cardiac differentiation through modulation of the WNT signaling pathway. Journal of molecular endocrinology. 2014;53(3):303-17.

23- Zuo S, Jones WK, Li H, He Z, Pasha Z, Yang Y, et al. Paracrine effect of Wnt11-overexpressing mesenchymal stem cells on ischemic injury. Stem cells and development. 2012;21(4):598-608.

24- Lian X, Hsiao C, Wilson G, Zhu K, Hazeltine L, M.Azarin S, 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;109(27):E1848–E57.

25- Saraswati S, Deskins DL, Holt GE, Young PP. Pyrvinium, a potent small molecule Wnt inhibitor, increases engraftment and inhibits lineage commitment of mesenchymal stem cells (MSCs). Wound repair and regeneration: official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society. 2012;20(2):185-93.

26- Connell JP, Ruano R, Jacot JG. Amniotic fluid-derived stem cells demonstrate limited cardiac differentiation following small molecule-based modulation of Wnt signaling pathway. Biomedical Materials. 2015;10(3):1-5.

27- Sharma A, Li G, Rajarajan K, Hamaguchi R, Burridge PW, Wu SM. Derivation of Highly Purified Cardiomyocytes from Human Induced Pluripotent Stem Cells Using Small Molecule-modulated Differentiation and Subsequent Glucose Starvation. 2015(97):e52628.

28- Sanchez-Freire V, Lee AS, Hu S, Abilez OJ, Liang P, Lan F, et al. Effect of human donor cell source on differentiation and function of cardiac induced pluripotent stem cells. Journal of the American College of Cardiology. 2014;64(5):436-48.

29- Shen H, Wang Y, Zhang Z, Yang J, Hu S, Shen Z. Mesenchymal Stem Cells for Cardiac Regenerative Therapy: Optimization of Cell Differentiation Strategy. Stem cells international. 2015;2015:524756.

30- Feng C. Suberoylanilide Hydroxamic Acid Promotes Cardiomyocyte Differentiation of Mesenchymal Stem Cells and the Mechanisams [Dissertation]. www.globethesis.com2010.