

Original Article

Evaluation of miR 26b 5p changes during differentiation of human endometrial stem cells into cardiomyocytes

Saadat S¹, Alani B^{2*}, Noureddini M¹, Maleki B¹, Farrokhan AR³, Verdi J⁴, Ghanbarian H⁵

1- Basic Sciences Research Institute, Kashan University of Medical Sciences, Kashan, I.R Iran.

2- Department of Applied Cell Sciences, Faculty of Medicine, Kashan University of Medical Sciences, Kashan, I.R. Iran.

3- Department of Cardiovascular, Faculty of Medicine, Kashan University of Medical Sciences, Kashan, I.R. Iran.

4- Department of Applied Cell Sciences, Faculty of Advanced Technologies in Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, I.R. Iran.

5- Department of Biotechnology, Faculty of Advanced Technologies in Medicine, Shaheed Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, I.R. Iran.

Received: 2022/02/1 | Accepted: 2022/05/1

Abstract:

Background: Recently, menstrual blood-derived stem cells as a unique source of stem cells with some features such as ease of access, high ability to proliferate and regenerate, lack of immune system stimulation and no tumorigenesis have raised great hopes for heart disease cell therapy. However, the regulatory mechanisms and role of miRNAs in controlling the differentiation of stem cells into cardiomyocytes are not fully understood. In this study, the level of human miR-26b-5p microRNA were investigated before and after differentiation of endometrial stem cells into heart cardiomyocytes.

Materials and Methods: Endometrial mesenchymal stem cells were differentiated into cardiomyocyte-like cells for 30 days in the presence of 5-azacitidine and fibroblast growth factor. Then, using bioinformatics studies, human miR-26b-5p microRNA was selected and its expression pattern was performed during days 0, 6, 12, 18, 24 and 30 of differentiation by Real Time qRT PCR

Results: Expression Level of human miR-26b-5p showed an uptrend differentiation between days 0 and 6 and then showed a significant decreasing trend differentiation from day 6 to day 18 and an uptrend again after day 18.

Conclusion: The non-uniformity in the expression of hsa-miR-26b-5p microRNA during the 24-day differentiation induction period indicates the existence of different messaging pathways involved in the differentiation process as well as different phases in the evolution and differentiation of cardiomyocytes. The miRNAs involved in the differentiation process and their possible role in turning off and on these messaging pathways at the beginning or end of a phase seems necessary.

Keywords: Endometrial mesenchymal stem cells, Cardiomyocyte, Human MIRN26A microRNA, Cell differentiation

***Corresponding Author**

Email: alani-be@kaums.ac.ir

Tel: 0098 315 510 3702

Fax: 0098 315 544 1112

Conflict of Interests: No

Feyz, Journal of Kashan University of Medical Sciences, June, 2022; Vol. 26, No 2, Pages 118-127

Please cite this article as: Saadat S, Alani B, Noureddini M, Maleki B, Farrokhan AR, Verdi J, et al. Evaluation of miR 26b 5p changes during differentiation of human endometrial stem cells into cardiomyocytes. *Feyz* 2022; 26(2): 118-27.

بررسی تغییرات miR-26b-5p در طی تمایز سلول‌های بنیادی آندومتر انسانی به کاردیومیوسیت

سمیه سعادت^۱، بهرنگ علنی^{۲*}، مهدی نورالدینی^۱، بهناز ملکی^۱، علیرضا فرخیان^۳، جواد وردی^۴، حسین قنبریان^۵

خلاصه:

سابقه و هدف: به تازگی سلول‌های بنیادی مشتق از خون قاعدگی به عنوان یک منبع منحصر به فرد از سلول‌های بنیادی با برخی ویژگی‌های مانند: سهولت دسترسی، توانایی تکثیر و خودتجدیدی بالا، عدم تحрیک سیستم ایمنی و عدم تومورزایی، امید فراوانی را برای سلول‌درمانی بیماری‌های قلبی ایجاد کرده است. با این حال، مکانیسم‌های تنظیمی و نقش miRNAها در کنترل تمایز سلول‌های بنیادی به کاردیومیوسیت‌ها کاملاً شناخته نشده است. در این پژوهش، تغییرات سطح میکرو RNA انسانی miR-26b-5p در قبل و بعد از تمایز سلول‌های بنیادی آندومتر به کاردیومیوسیت بررسی شد.

مواد و روش‌ها: تمایز سلول‌های بنیادی آندومتر به سلول‌های کاردیومیوسیت در طی سی روز در حضور ۵-آزاسیتیدین و فاکتور رشد فیبروبلاستی صورت گرفت. سپس با بهره‌گیری از بررسی‌های بیوانفورماتیک، میکرو RNA انسانی miR-26b-5p انتخاب شد و الگوی بیان آن طی روزهای صفر، ۶، ۱۲، ۱۸، ۲۴ و ۳۰ تمایز با تکنیک Real Time qRT-PCR بررسی گردید.

نتایج: در سطح میکرو RNA انسانی miR-26b-5p بین روزهای صفر و ۶ تمایز، روند صعودی داشته، سپس از روز ۶ تا ۱۸ تمایز، روند کاهشی معنی دار و بعد از روز ۱۸ تمایز، دوباره روند صعودی را نشان داده است.

نتیجه‌گیری: عدم یکنواختی در روند بیان میکرو RNA انسانی miR-26b-5p طی دوره ۳۰ روزه القای تمایز، حاکی از وجود مسیرهای پیام‌رسانی مختلف دخیل در روند تمایز و همچنین فازهای متفاوت در سیر تکامل و تمایز کاردیومیوسیت‌ها می‌باشد و انجام مطالعات بیشتر بر روی miRNAهای دخیل در روند تمایز و بررسی نقش احتمالی آن‌ها در خاموش و روشن کردن این مسیرهای پیام‌رسانی در شروع یا خاتمه یک فاز، ضروری به نظر می‌رسد.

واژگان کلیدی: سلول بنیادی مزانشیمی آندومتر، کاردیومیوسیت، میکرو RNA انسانی MIRN26A، ژن فاکتور رونویسی جعبه-5 (TBX5)

دو ماهنامه علمی - پژوهشی پیش، دوره بیست و ششم، شماره ۲، خرداد - تیر ۱۴۰۱، صفحات ۱۱۸-۱۲۷

این کاردیومیوسیت‌های نکروزه در قلب آسیب‌دیده به طور پیشرونده‌ای با سلول‌های غیرانقباضی فیبروبلاستی جایگزین شده، در محل آسیب، بافت اسکاری تشکیل می‌شود که در درازمدت منجر به نارسایی قلبی می‌شود [۱]. اخیراً با توجه به ماهیت سلول‌های بنیادی، استفاده از روش‌های سلول‌درمانی در بیماری‌های قلبی گسترش یافته و امیدهای تازه‌ای را برای بیماران مبتلا به نارسایی قلبی به ارمغان داشته است [۲]. بنابراین یافتن مخزن سلولی در دسترس که بتواند در صورت نیاز به کاردیومیوسیت‌ها متمايز شود و به محل آسیب‌دیده تزریق گردد، تحول شنگرفی را در درمان این بیماران فراهم خواهد نمود [۳]. خون قاعدگی بافت آندومتر یک منبع غنی از سلول‌های بنیادی چندتوان با برخی ویژگی‌هایی مثل سهولت دسترسی، توانایی تکثیر و خودتجدیدی بالا، عدم وجود مشکلات اخلاقی سلول‌های بنیادی جنبینی، عدم تحрیک سیستم ایمنی و تومورزایی، امید فراوانی را برای سلول‌درمانی ایجاد کرده است و یک استراتژی نوظهور برای بازسازی میوکارد و درنتیجه بهبود عملکرد قلب پس از افمارکتوس میوکارد (MI) می‌باشد [۴-۵]. Liu و همکارانش در سال ۲۰۱۹ در تحقیقی که بر روی پتانسیل درمانی سلول‌های بنیادی آندومتر رحم (MenSC) در بیماری‌های قلبی

مقدمه

بیماری‌های قلبی - عروقی، از جمله مشکلات بزرگ امروزی جوامع بشری بوده، نقص در عملکرد کاردیومیوسیت‌ها یکی از علل اصلی نارسایی قلبی محسوب می‌گردد [۶]. کاردیومیوسیت‌های انسان، سلول‌های پس‌متیوزی هستند و بعد از تولد، توانایی تکثیر خود را از دست می‌دهند؛ بنابراین بعد از وقوع سکته قلبی، این سلول‌ها نکروزه می‌شوند.

۱. پژوهشکده علوم پایه، مرکز تحقیقات فیزیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی کاشان

۲. گروه علوم سلوی کاربردی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کاشان

۳. گروه قلب، دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کاشان

۴. گروه علوم سلوی کاربردی، دانشکده فن‌آوری‌های نوین، دانشگاه علوم پزشکی تهران

۵. گروه زیست‌فن‌آوری پزشکی، دانشکده فن‌آوری‌های نوین، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

*لشان نویسنده مسؤول:

کاشان، بلوار پزشک، دانشگاه علوم پزشکی و بهداشتی و درمانی کاشان، دانشکده پزشکی، طبقه سوم، گروه علوم سلوی کاربردی

تلفن: ۰۳۱۵۵۴۱۱۱۲ - ۰۳۱۵۵۱۰۳۷۰۲

پست الکترونیک: alani-be@kaums.ac.ir

تاریخ پذیرش نهایی: ۱۴۰۱/۲/۱۱

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۱۱/۱۲

مسیر پیام رسانی Wnt از طریق هدف قراردادن بیان ژن‌های $Gsk3\beta$ و $Wnt5a$ سبب افزایش تکثیر سلولی P19 گشته، بهنوبه خود باعث تسهیل فرآیند تمایز و تعهد سلول‌های بنیادی به کاردیومیوسیت‌ها Homo sapiens می‌شود [۲۱]. تابه‌حال درخصوص نقش hsa-miR-26b-5p (human) در تمایز سلول‌های اندومتر انسانی به سلول‌های قلبی مطالعه‌ای انجام نشده است. در این پژوهش، تغییرات سطح بیان miR-26b-5p در قبل و بعد از تمایز سلول‌های بنیادی اندومتر انسانی به کاردیومیوسیت بررسی گردید.

مواد و روش‌ها

این طرح به شماره (کد پژوهشی) ۹۸۹۵ در دانشگاه علوم پزشکی کاشان مصوب شده است. پژوهش حاضر به صورت مداخله‌ای تجربی با کد اخلاق به شماره IR.KAUMS.REC.1398.030 فن‌آوری دانشگاه علوم پزشکی کاشان برروی سلول‌های بنیادی اندومتر انسانی مشتق از خون قاعدگی در آزمایشگاه سلولی گروه سلولی کاربردی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی کاشان انجام گرفت. این سلول‌ها از پژوهشگاه فناوری‌های نوین علوم زیستی جهاد دانشگاهی – ابن سينا خریداری شد. حجم نمونه، تعداد T25 ۱۰۰۰۰۰ سلول بنیادی اندومتر بود که در هر ۶ فلاسک به منظور تمایز به سلول کاردیومیوسیت استفاده شد. معیار تقسیم‌بندی گروه‌های مورد مطالعه براساس روزهای تمایز بود و به ۶ گروه تحت مطالعه تقسیم شدند. سلول‌های بنیادی اندومتر بدون دریافت محیط تمایزی قلبی (بدون مداخله) روز صفر به عنوان گروه یک در نظر گرفته شدند و نمونه‌های مداخله بعد از دریافت محیط تمایزی قلبی در روزهای ۶، ۱۲، ۱۸، ۲۴، ۳۰ به ترتیب گروه‌های دو تا شش نامگذاری شدند.

کشت سلولی و افزودن محیط تمایزی:

سلول‌های بنیادی مزانشیم اندومتر در محیط کشت آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین – استرپتومایسین داخل فلاسک T25 و در دمای ۳۷ درجه و دی‌اکسید کربن ۵ درصد کشت داده شدند. محیط کشت سلول‌ها هر ۴۸ ساعت یک بار تعویض شد. هر روز سلول‌های کشت داده شده با استفاده از میکروسکوپ معکوس مورد بررسی قرار گرفتند.

تعیین مارکرهای سطحی سلول‌های بنیادی مزانشیم اندومتر با روش فلوسایتومتری:

جهت اطمینان از ماهیت مزانشیمی سلول‌های بنیادی تهیه شده، تعداد ۲۰۰۰۰ سلول بنیادی مزانشیمی سلول‌های حاصل از پاساز چهارم

صورت گرفت، نشان دادند که سلول‌های بنیادی اندومتر رحم به واسطه اثرات پاراکرین، ترشح عوامل رگزایی و محرك رشد، منجر به بازسازی میکاراد آسیب‌دیده و درنهایت کمک به بهبود عملکرد قلبی می‌شوند [۲]. رحیمی و همکاران در سال ۲۰۱۷، با ارزیابی توان تمایز سلول‌های بنیادی مشتق از خون قاعدگی به کاردیومیوسیت‌ها نشان دادند که این سلول‌ها، جمعیت سلولی منحصر به‌فردی هستند که پتانسیل خوبی را جهت تمایز به کاردیومیوسیت‌ها دارند [۸]. اکثر رویکردهای فعلی، اغلب از عوامل بیولوژیکی و شیمیابی مختلف به عنوان عواملی برای تحریک و تعدیل تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی به کاردیومیوسیت‌ها استفاده می‌کنند [۹-۱۱]. از یک دهه پیش، برای اولین بار گزارش شد که microRNA‌ها نقش اساسی را در کنترل و تنظیم تکامل قلب ایفا می‌کنند و تا به امروز مطالعات بسیاری تأیید کرده‌اند که miRNA‌ها می‌توانند در توسعه سلولی، تمایز و تکثیر کاردیومیوسیت‌ها نقش کلیدی ایفا کنند [۱۲، ۱۳]. مولکول‌های microRNAs گروهی از RNA حفاظت‌شده تکرشتهای کوتاه با طول ۱۹ تا ۲۳ نوکلئوتید و غیر کدشونده هستند که به عنوان تنظیم‌کننده‌های بعد از رونویسی بیان ژن عمل می‌کنند [۱۴]. علیرغم مطالعات بسیاری که برروی نقش miRNA در تمایز مطالعات جامعی کاردیومیوسیت‌ها صورت گرفته است، اما هنوز اطلاعات جامعی درمورد مسیرهای سیگنالینگ درگیر در تمایز در تعامل با miRNA‌ها وجود ندارد و نیاز به تحقیقات وسیع‌تر حس می‌شود. تحقیقات نشان داده که به عنوان یک تنظیم‌کننده مهم در سلطان‌زایی و سایر فرآیندهای بیولوژیکی، از جمله تکثیر، رگزایی، آپوپتوز و التهاب شناسایی شده است [۱۵، ۱۶]. miR-26 انسانی در ناحیه ایتون از ژن Ctdsp2 قرار دارد و می‌تواند تمایز عصبی را همراه با ژن میزبان خود تنظیم کند [۱۷، ۱۸]. مطالعات نشان داده که سطح بیان miR-26 در بیماران فیبریلاسیون دهلیزی کاهش یافته است. بیان اجباری miR-26 با هدف قراردادن ژن GATA4 هیپرتروفی قلبی را کاهش می‌دهد. علاوه‌بر این، سطح miR-26 پلاسمما در بیماران نارسایی حاد قلبی کاهش می‌یابد [۱۶، ۱۹]. این نتایج نشان می‌دهد که احتمالاً miR-26b نقش مهمی در توسعه و حفظ عملکرد قلب دارد. و همکاران در سال ۲۰۱۳ نشان دادند که افزایش بیان miR-26b-5p، رونویسی ژن‌های کانال‌های پتانسیمی KIR2.1 را که نقش مهمی در حفظ پتانسیل عمل در کاردیومیوسیت‌ها دارند، افزایش می‌دهند. همچنین miR-26b-5p منجر به افزایش بیان ژن‌های مرتبط با کاردیومیوسیت‌های بالغ، از جمله cTNT و α -MHC و α -actinin می‌شود [۲۰]. Wang و همکاران در سال ۲۰۱۷ نشان دادند، miR-26b، با تغییل فعالیت

RNA استخراجی به سرعت به فریزر -۷۰ ممتنقل شد. سپس شروع سنتز cDNA از نسخه رونوشت ژن *TBX5* با استفاده از پرایمر Random Hexamer براساس پروتکل کیت Genall (کره جنوبی) و RT Stem-Loop miRNA ۲۶b-5p انسانی مطابق پروتکل شرکت آنال (ایران) صورت پذیرفت. در ادامه، واکنش‌های کمی زنجیره‌ای پلیمرازی هر یک از cDNAهای ژن *TBX5* به واسطه پرایمراهای طراحی شده (جدول شماره ۱) و پرایمر مولکول miR-26b-5p Ampliqon برای حجم ۱۱ μl تنظیم شد و برنامه PCR به منظور تکثیر قطعات موردنظر در دستگاه ترموسایکلر ABI شرکت آنال (ایران) با استفاده از کیت Master Mix شرکت PCR برای حجم ۲۵ μl تنظیم شد و برنامه به منظور تکثیر ایالات متحده صورت گرفت (جدول شماره ۲). در پایان؛ بیان نسبی Relative quantity نسخه رونوشت هر ژن هدف نسبت به نسخه رونوشت ژن ساختمانی خانه‌نگهدار House keeping در همه نمونه‌ها به صورت بیان نسبی براساس فرمول $2^{-\Delta\Delta Ct}$ مورد آنالیز قرار گرفت. گفتنی است که ژن‌های *GAPDH* و *SNORD47* به عنوان ژن‌های miRNAs و mRNAs مطالعه شده‌اند.

در هر چاهک پلیت ۲۴ خانه کشته داده شدند. پس از گذشت ۷۲ ساعت، پلیت سلولی تریپسینه شد و پس از جداسدن سلول‌های CD34 حاصل از پلیت، میزان بیان مارکرهای سطح سلولی ۳۴ CD73 با روش فلوسایتوometری در آزمایشگاه شرکت سلول بافت زیست تهران اندازه‌گیری شد.

القای تمایز قلبی در سلول‌های بنیادی مزانشیمی اندومتر برای القای تمایز قلبی در سلول‌های بنیادی مزانشیمی اندومتر، سلول‌ها به مدت ۳۰ روز در مععرض محیط تمایزی قلبی قرار گرفتند. جهت القای تمایز از محیط تمایزی طبق پروتکل منتشر شده توسط XU در حضور ۵-آزاسیتیدین و فاکتور رشد فیبروبلاستی استفاده شد [۲۲]. در طول دوره القای تمایز، سلول‌ها با استفاده از میکروسکوپ معکوس مجهر به دوربین عکاسی مورد بررسی قرار گرفت و عکس برداری از سلول‌ها در روزهای صفر تا ۲۴ تمایزی و روز سیام تهیه شد. اندازه‌گیری بیان ژن اختصاصی قلبی در سلول‌های تمایز داده شده با تکنیک (Real Time qRT-PCR) Real-Time Quantitative Reverse Transcription PCR برای جداسازی هم‌زمان mRNA و miRNA از کیت ستونی Hybrid-R miRNA-mini شرکت Genall استفاده شد و کمیت mRNA و miRNA با استفاده از دستگاه نانودراب پر شرکت Thermo ایالات متحده اندازه‌گیری شد. درنهایت

جدول شماره ۱- توالی‌های پرایمر مورد استفاده برای اندازه‌گیری بیان ژن اختصاصی قلبی با تکنیک Real Time qRT-PCR

نام ژن	پرایمر فوروارد	پرایmer ریورس
<i>TBX5</i>	5'-CATCAACCAGCCACATTG-3'	5'-GACTCCAACCTACGCCTA-3'
<i>GAPDH</i>	5'-GGACTTCCTCGGTGATAC-3'	5'-CGGTGACTGTAGCCATAT-3'

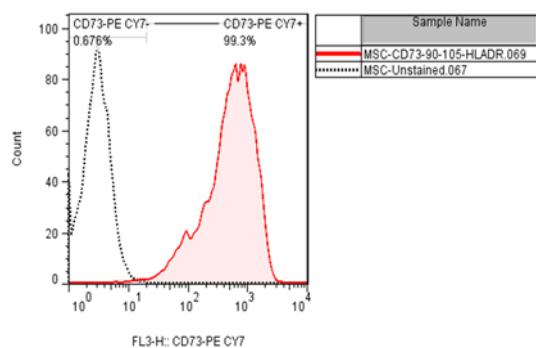
جدول شماره ۲- برنامه PCR به منظور تکثیر قطعات cDNA با تکنیک Real Time qRT-PCR

نام مرحله	درجه حرارت	زمان	هدف
تغییر ماهیت کلی (تقلیب)	۹۴ درجه	۲ دقیقه	تکرشتهای شدن کلی و اویله
تغییر ماهیت	۹۴ درجه	۳۰ ثانیه	تکرشتهای شدن کلی
پیوندزنانی و مرحله توسعه	۷۷ درجه	۳۰ ثانیه	دما اتصال آغازگرها به cDNA و تکثیر
توسعه تکمیلی	۷۷ درجه	۲۴۰ ثانیه	تکمیل سنتز DNA

تست Tukey استفاده شد. تمام داده‌ها به صورت Mean±SEM (میانگین \pm میانگین خطای استاندارد) محاسبه شد. مقدار $P \leq 0.05$ با یک علامت، $P \leq 0.01$ با دو علامت و $P \leq 0.001$ با سه علامت معنی‌داربودن نسبت به گروه کنترل بر روی نمودارهای گروه‌های

روش تجزیه و تحلیل داده‌ها تجزیه و تحلیل داده‌های گردآوری شده به وسیله نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۰ انجام شد. جهت مقایسه میانگین داده‌ها، بین گروه کنترل و گروه‌های آزمایشی از آزمون One-way ANOVA و

آزمایشی نشان داده شد. نمودارها بوسیله نرم افزار Excel رسم گردید.



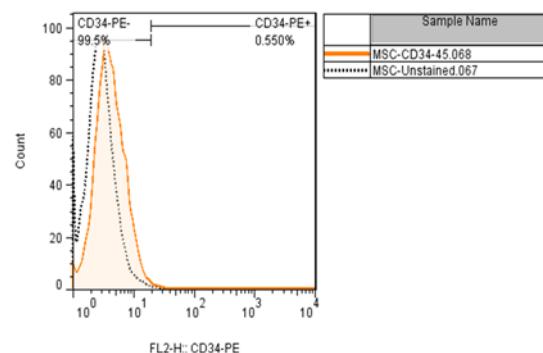
نمودار شماره ۲- نتیجه آنالیز فلوزایتمتری سلول‌های بنیادی مزانشیمی اندومنتر در مجاورت آنتی‌بادی CD73 نشان‌دهنده بیان این مارکر در سطح سلول‌ها است. بیان این نشانگر سطحی در سلول‌های بنیادی اندومنتر ۹۹/۳ درصد می‌باشد.

ارزیابی مورفولوژیکی در طی تمایز سلول‌های بنیادی اندومنتر به سمت سلول‌های کاردیومیوسمیت قلبی در سلول‌های پاساژ چهارم که به مدت ۲۴ روز در محیط تمایزی قلبی قرار گرفته بودند، در روز سیام، تغییرات مورفولوژیکی تمایز به سمت سلول‌های قلبی مشاهده شد. مورفولوژی سلول‌های کشت‌داده شده در محیط تمایزی با میکروسکوپ فاز کتراست مشاهده شد. این سلول‌ها قبل از تمایز شبیه‌بروبلاستی هستند. در حین تمایز، پس از اضافه کردن آزادیتیدین، سلول‌ها کم کم شروع به تغییر شکل نموده، دوکی شکل می‌شوند و در روز ۶ القای تمایز سلول‌هایی دیده شد که شروع به کشیده شدن، تشکیل زواید و انشعاباتی برای نزدیک شدن و اتصال با سلول‌های مجاور کرده بودند. این روند در طی روزهای ۱۲ و ۱۸ تمایز افزایش یافت، به طوری که در روز ۱۸ القای تمایز عده سلول‌ها کشیده بود و با یکدیگر Gap Junction تشکیل داده بودند و سلول‌های دوهسته‌ای مشاهده شد که ناشی از ادغام دیواره سلولی بودند. در روزهای ۲۴ و ۳۰ القای تمایز اکثر سلول‌ها مورفولوژی کشیده، مخطط و stick-like داشتند و ساختاری یکپارچه و منسجم مشاهده شد (شکل شماره ۱).

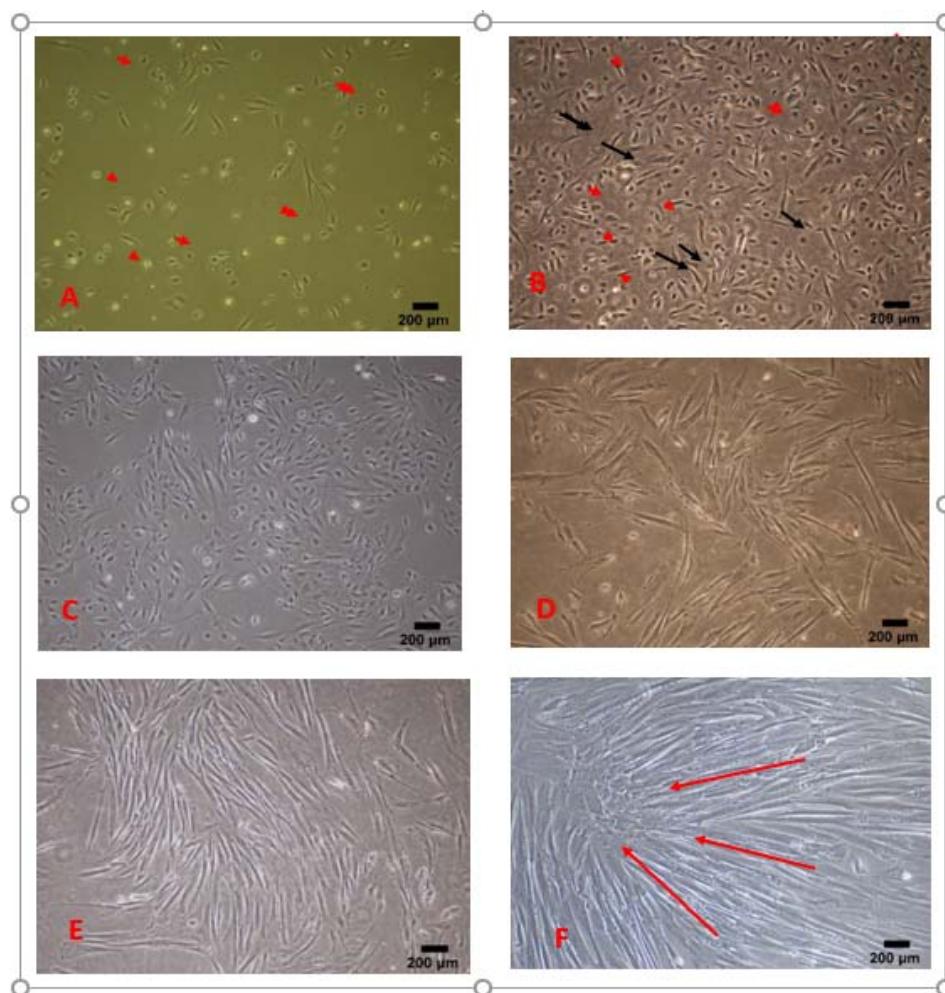
نتایج

ارزیابی خصوصیات سلول‌های بنیادی اندومنتر رحم کشش شده

به این منظور با استفاده از روش فلوزایتمتری بیان نشانگرهای سطحی CD34 و CD73 در سلول‌های بنیادی مشتق از بافت اندومتر بررسی شدند. نتایج حاصل از فلوزایتمتری نشان داد که سلول‌های بنیادی اندومتر رحم انسان پس از پاساژ چهارم نشانگرهای سطحی CD34 را که مربوط به سلول‌های بنیادی خونساز هستند، بیان نمی‌کنند و بیان این نشانگر سطحی ۰/۵۵ درصد می‌باشد. نتایج حاصل از فلوزایتمتری برای نشانگر سطحی CD73 نشان داد که سلول‌های بنیادی اندومتر این مارکر را که مربوط به سلول‌های بنیادی مزانشیمی هستند، بیان می‌کند و بیان این نشانگر سطحی ۹۹/۳ درصد می‌باشد (نمودارهای شماره‌های ۱ و ۲).



نمودار شماره ۱- آنالیز فلوزایتمتری سلول‌های بنیادی مزانشیمی اندومتر در مجاورت آنتی‌بادی CD34 نشان‌دهنده بیان منفی این مارکر در سطح سلول‌های اندومتر است. بیان این نشانگر سطحی در سلول‌های بنیادی اندومتر ۰/۵۵ درصد می‌باشد.



شکل شماره ۱- تغییرات مورفولوژی سلول‌های بنیادی مشتق از اندومتر به کاردیومیوسیت در طول ۳۰ روز با استفاده از میکروسکوپ معکوس بزرگنمایی ۱۰X.

در روز ۰ (القا؛ تمایز، مورفولوژی با ساختاری منسجم و یکپارچه می‌باشد (فلش قرمز).

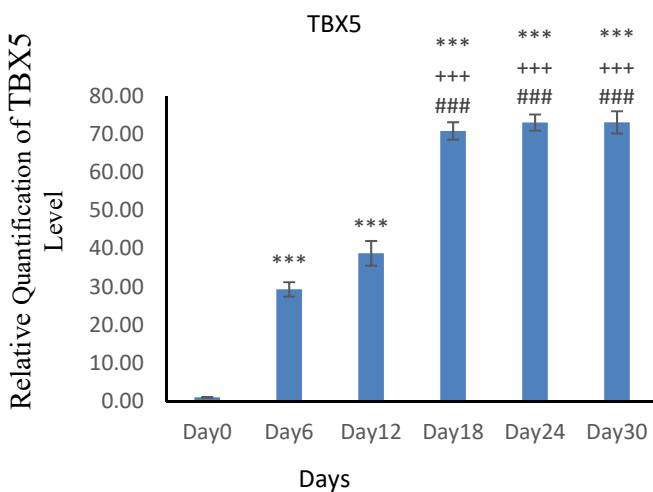
نتایج مربوط به بیان نسبی نسخه رونوشت ژن *TBX5* طی دوره ۳۰ روزه تمایز سلول‌های بنیادی اندومتر به کاردیومیوسیت با استفاده از روش Real Time qRT-PCR

بيان نسبی نسخه رونوشت ژن *TBX5* طی دوره ۳۰ روزه تمایز به صورت ۳ تکرار با تکنیک Real Time qRT-PCR بررسی شد. با توجه به نمودار شماره ۳، بیان ژن *TBX5* در روز ۶ تمایز نسبت به روز صفر (گروه کنترل) افزایش بیان معناداری را نشان داد ($P \leq 0.001$). با طی شدن روند القای تمایز و تبدیل عدد بیشتری از سلول‌های بنیادی اندومتر به سلول‌های قلبی و تعداد سلول‌های بیان کننده *TBX5* روند افزایشی نشان داد؛ بهطوری که در روز ۱۲ القای تمایز و میزان بیان نسبی نسخه رونوشت این ژن نسبت روز صفر اختلاف معناداری نشان داد ($P \leq 0.001$) و همچنین بین بیان این ژن در روز ۱۲ با روز ۶ نیز اختلاف بیان معناداری مشاهده

شکل A. سلول‌های بنیادی اندومتر انسانی روز صفر قبل از اضافه کردن محیط تمایزی در محیط کشت DMEM حاوی FBS در صد و آنتی بیوتیک. سلول‌های بنیادی به کاربرده شده بعد از قرارداده شدن در محیط کشت به راحتی توانستند به کف محیط کشت چسبیده، رشد کنند. مورفولوژی سلول‌ها ظاهر فیبروبلاست مانند آن‌ها را به خوبی نشان می‌دهد (نوك پیکان)؛ شکل B. سلول‌های بنیادی در روز ۶ القای تمایز در حال کشیده شدن و دوکی شدن هستند (فلش سیاه)؛ با این حال هنوز در صد زیادی از سلول‌ها، مورفولوژی فیبروبلاستی منشعب دارند؛ شکل C. در روز ۱۲ تعداد زیادی از سلول‌های در حال تمایز مورفولوژی کشیده و دوکی پیدا کرده؛ شکل D. سلول‌های در حال تمایز در روز ۱۸ القای به صورت دوکی شکل و با انشعاباتی به سمت یکدیگر کشیده شده‌اند؛ شکل E. سلول‌ها در روز ۲۴ القای تمایز و ۹۰ درصد مورفولوژی کشیده و stick-like و پیدا کرده و در یک راستا بودند؛ شکل F. نمایی از کاردیومیوسیت‌ها

ژن با روزهای صفر، ۶ و ۱۲ نیز اختلاف بیان معناداری نشان داد ($P \leq 0.001$)؛ در حالی که اختلاف معنی‌داری در نسخه رونوشت این ژن در روز ۲۴ با روزهای ۱۸ و ۳۰ مشاهده نشد ($P=ns$).

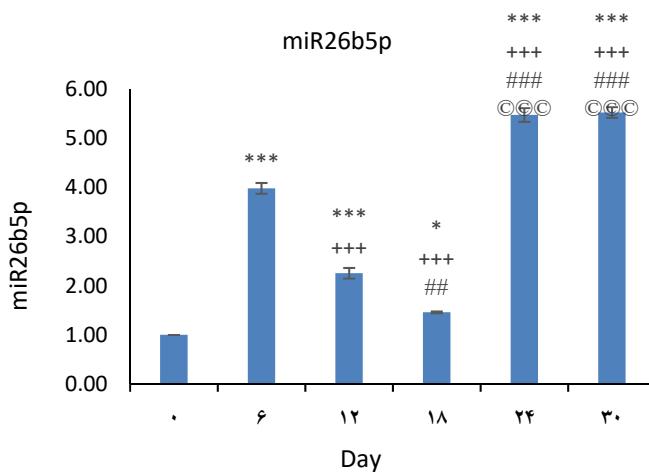
شد (۰/۰۱). روز ۱۸ القای تمايز ميزان بيان نسخه رونوشت ژن *TBX5* نسبت به روزهای صفر، ۶ و ۱۲ افزایش معناداری *TBX5* نشان داد (۰/۰۱). در روز ۲۴ دوره تمايز، نسخه رونوشت اين



نمودار شماره ۳- نمودار میزان نسبی بیان نسخه رونوشت ژن *TBX5* در سلول‌های بنیادی مزانشیمی تحت تیمار با محیط تمايز قلبی طی دوره ۲۴ روزه تمايز و در روز سیام در روزهای صفر، ۱۲، ۱۸، ۲۴ ام و روز سیام؛ بررسی سلول‌های تمايزنيافته در روز صفر، به عنوان کنترل منفی و داده‌های این آزمایش به صورت $Mean \pm SEM$ در نظر گرفته شده است. $(P \leq 0.001)$ *** در مقایسه با گروه روز صفر، $(P \leq 0.001)$ # در مقایسه با گروه روز ۶ القای تمايز، $(P \leq 0.001)$ ## در مقایسه با گروه روز ۱۲ القای تمايز، $(P \leq 0.001)$ ### در مقایسه با گروه روز ۱۸ القای تمايز.

همچنان نسبت به روز صفر بالاتر و معنی‌دار بود ($P \leq 0.001$). این روند کاهشی تا روز ۱۸ تمايز ادامه پیدا کرد، متنها این ميزان به ترتیب، نسبت به روز صفر، ۶ و ۱۲ همچنان معنادار مشاهده شد ($P \leq 0.05$)، ($P \leq 0.01$) و ($P \leq 0.01$). ميزان بيان اين microRNA در روز ۲۴ ام القای تمايز روند صعودی به خود گرفت و نسبت به روزهای صفر، ۶، ۱۲ و ۱۸ تمايز افزایش معناداری را نشان داد ($P \leq 0.001$). اين افزایش در روز ۳۰ تمايز مشاهده شد و بيان اين مولکول با روزهای صفر، ۶ و ۱۲ نیز ۱۸ اختلاف بیان معناداری نشان داد ($P \leq 0.001$)؛ در حالی که تغییر معنی‌داری در بيان اين مولکول بين روزهای ۲۴ و ۳۰ مشاهده نشد ($P=ns$).

نتایج مربوط به بيان hsa-miR-26b-5p طی دوره ۳۰ روزه تمايز سلول‌های بنیادی اندومتر به کاردبیومیوسیت با استفاده از آنالیز Real Time qRT-PCR روند بيان hsa-miR26a-5p توسط PCR طی دوره ۳۰ روزه تمايز به صورت ۳ تکرار بررسی شد. با توجه به نمودار شماره ۴، بعد از اضافه کردن محیط تمايزی قلبی به سلول‌های بنیادی اندومتر، افزایش بيان معناداری در سلول‌های روز ۶ تمايزی نسبت به روز صفر (گروه کنترل) مشاهده شد ($P \leq 0.001$). بيان اين microRNA در روز ۱۲ کاهش بيان معناداری را نسبت به روز ۶ نشان داد ($P \leq 0.001$)، ولی اين تغییر



نمودار شماره ۴- نمودار میزان بیان نسبی میکرو RNA انسانی miR-26b-5p در سلول‌های بنیادی مزانشیمی تحت تیمار با محیط تمایز قلبی طی دوره القای تمایز ۳۰ روزه در گروه در روزهای تمایزی $0, 18, 12, 6, 24, 30$: بررسی سلول‌های تمایزینافه در روز صفر به عنوان کنترل منفی و داده‌های آزمایش به صورت Mean \pm SEM در نظر گرفته شده است.

*** در مقایسه با گروه روز صفر، $(P \leq .001)$ + + + در مقایسه با گروه روز ۶ القای تمایز، $(P \leq .001)$ ##### در مقایسه با گروه روز ۱۲ القای تمایز، $(P \leq .001)$ ④③② در مقایسه با گروه روز ۱۸ القای تمایز

اللای تمايز سلول P19 پرتوان به کار دیومیوسیت های عملکردی

نشان داده که miR-26 می تواند با تنظیم سیگنال های Wnt مونجر به تولید کاردیومیوسمیت های عملکردی گردد، به طوری که مهار بیان Wnt در مولکول miR-26 سبب سرکوب شدن مسیر سیگنال دهنده Wnt طول تمايز شد [۲۱]. از طرف دیگر بیان بیش از حد مولکول miR-26b طول تمايز شد [۲۱]. از طرف دیگر بیان بیش از حد مولکول Mesp1، از 26b سبب افزایش بیان هر دو ژن Brachury و Mesp1 مارکرهای مهم فاز مزودرمی، در روز ۴ پس از شروع تمايز به عنوان مرحله اویله مزودرمی، گردید [۲۱]. یافته های حاضر در مورد بیان hsa-miR-26b-5p نیز در روز ۶ افزایش معنی داری داشت. این روند افزایشی بین روزهای صفر تا شش به نظر می رسد با فاز Wnt β -catenin مطابقت نموده، ارتباط miR-26 و مسیر Wnt β -catenin در این بازه زمانی را افزایش می دهد؛ به طوری که به نظر می رسد افزایش میزان miR-26b-5p برای فعال کردن مسیر سیگنالینگ Wnt β - catenin و القای فاز مزودرمی و تکثیر سلول های مزودرمی لازم است. در این مطالعه، کاهش میزان hsa-miR-26b-5p پس از روز ششم القای تمايز و ادامه این کاهش تا روز ۱۸ مشاهده شد. تحقیقات نشان داده که سرکوب بیان ژن های Wnt β - catenin برای خروج سلول ها از فاز مزودرمی، خود نوسازی، تکثیر و ورود به فاز پیش ساز قلبی که فاز اصلی تمايزی است، لازم می باشد. از طرف دیگر مطالعات نشان داده اند که بیان ژن های رونویسی کانال های پتانسیمی KIR2.1 که نقش مهمی در حفظ پتانسیل عمل در کاردیومیوسمیت ها دارند، با کاهش بیان miR-26 افزایش می یابد [۲۰]. این یافته ها به نظر نقش کاهشی، مولکول

دیجیٹ

در این تحقیق تجربی، بیان میکرو RNA انسانی 26b-5p و نسخه رونوشت ژن *TBX5* به عنوان یکی از مهم‌ترین مارکرهای کاردیومیوسیتی، طی تمایز ۳۰ روزه سلول‌های بنیادی آندومتر به کاردیومیوسیت موردن ارزیابی قرار گرفت. یافته‌های حاضر نشان می‌دهد که بیان مولکول hsa-miR-26b-5p روند یکنواختی را در طول دوره ۳۰ روزه تمایز طی نکرده است. از طرف دیگر بیان مارکر کاردیومیوسیتی *TBX5*، روند افزایشی کاملاً یکنواختی را از روز صفر تا روز ۳۰ تمایز نشان داد. تحقیقات متعدد نشان داده که در طول مراحل اوّلیه تمایز، برهم‌کنش ۳ مسیر اصلی سیگنانلینگ FGF و BMP در پیشبرد تمایز نقش اصلی را ایفا می‌نمایند [۲۳]. Rowton و همکاران در سال ۲۰۲۱ روند تکامل قلب و سلول‌های قلبی را در محیط‌های *invivo* و *in vitro* در *Invitro* به فازهایی، از مزودرم تا پیش‌ساز قلبی و کاردیومیوسیت نابلغ تا کاردیومیوسیت‌های بالغ تقسیم می‌شود که هر کدام از این فازها مسیر سیگنانلینگ جدا و فاکتورهای رونویسی خاص خود را دارند که مشخصه آن فاز می‌باشد [۲۴، ۲۵]. اوّلین مرحله تمایز کاردیومیوسیت‌ها شامل ایجاد مزودرم است که مسیر WNT برای ورود به این فاز ضروری بوده، پس از آن مهار می‌شود [۲۶]. فعال شدن مسیر پیام‌رسانی *wnt* برای القای تمایز و ورود به فاز مزودرمی لازم است و الگوی بیان آن در طی دوره تمایز کاردیومیوسیت‌ها دوفازی می‌باشد [۲۶، ۲۷]. همچنین بررسی مسیر

باتوجه به روند افزایشی یکنواخت بیان نسخ رونوشت ژن *TBX5* تا روز ۳۰ که نشان‌دهنده طی کردن روند تمایزی و بلوغ کاردیومیوسیت‌ها است، همچنین الگوی بیان فاز یک miR-26b-5p، احتمال می‌رود که عملکرد miR-26b-5p در رابطه با مسیرهای سیگنالینگ مختلف دخیل در فرآیند تمایزی و برای پیشبرد فرآیند تمایز کاردیومیوسیت‌ها لازم باشد. این امر به واسطه اثرگذاری بر بیان یک پروتئین می‌تواند به مهار یک مسیر سیگنالینگ و ورود سلول‌ها به فاز جدید با فعال شدن مسیرهای سیگنالینگ جدید در طی فرآیند تمایز منجر گردد [۱۰]. این مسیرهای پیام‌رسانی در مقاطع زمانی متفاوت به واسطه فعالیت فاکتورهای واسطه انتقال پیام سیتوپلاسمی و فاکتورهای رونویسی متفاوت و همچنین میکروRNAهای تنظیمی، در شروع و یا پایان یک فاز، فعال یا غیرفعال می‌شوند [۲۱، ۲۲]. به نظر می‌رسد این نتایج، مولکول miR-26b-5p را به عنوان یک کاندیدای بالقوه برای متعادل کردن مسیرهای پیام‌رسانی در تمایز سلول‌های بنیادی به کاردیومیوسیت نشان می‌دهد.

نتیجه‌گیری

باتوجه به عدم بررسی مسیرهای سیگنالینگ دخیل در این تغییر بیان، مطالعه بیشتر روی نقش مولکول miR-26b-5p در مسیرهای سیگنالینگ اصلی تمایز سلول‌های بنیادی آندومتر به کاردیومیوسیت‌ها مانند مسیر سیگنالینگ WNT به منظور بهینه‌سازی تولید کاردیومیوسیت‌ها در محیط *in vitro* ضروری به نظر می‌رسد.

تشکر و قدردانی

نویسندهای این مقاله از تشریک مساعی همکاران محترم در معالن تحقیقات و فن‌آوری دانشگاه علوم پزشکی کاشان کمال تشکر و امتنان را دارند.

References:

- [1] Yester J, Kühn B. Mechanisms of Cardiomyocyte Proliferation and Differentiation in Development and Regeneration. *Curr Cardiol Rep* 2017; 19(2): 13-.
- [2] Liu Y, Niu R, Li W, Lin J, Stamm C, Steinhoff G, et al. Therapeutic potential of menstrual blood-derived endometrial stem cells in cardiac diseases. *Cell Mol Life Sci* 2019; 76(9): 1681-95.
- [3] Guo X, Bai Y, Zhang L, Zhang B, Zagidullin N, Carvalho K, et al. Cardiomyocyte differentiation of mesenchymal stem cells from bone marrow: new regulators and its implications. *Stem Cell Res The* 2018; 9(1): 1-12.
- [4] Kazemzadeh N, Sarvari MH, Jani MR, Razmara MR. Stem Cells Therapy For Peripheral Arterial Disorders. *iranian journal of cardiovascular nursing*. 2015; 3(4): 64- 73. [in Persian]
- [5] Bozorgmehr M, Gurung S, Darzi S, Nikoo S, Kazemnejad S, Zarnani AH, et al. Endometrial and menstrual blood mesenchymal stem/stromal cells: biological properties and clinical application. *Front Cell Dev Biol* 2020; 8.

- [6] Darzi S, Werkmeister JA, Deane JA, Gargett CE. Identification and characterization of human endometrial mesenchymal stem/stromal cells and their potential for cellular therapy. *Stem Cells Transl Med* 2016; 5(9): 1127-32.
- [7] Guo Y, Yu Y, Hu S, Chen Y, Shen Z. The therapeutic potential of mesenchymal stem cells for cardiovascular diseases. *Cell Death Dis* 2020; 11(5): 1-10.
- [8] Rahimi M, Zarnani AH, Mohseni-Kouchesfehani H, Kazemnejad S. Evaluation of differentiation potential of menstrual blood-derived stem cells to cardiomyocytes in vitro. *Daneshvar Med* 2016; 23(123): 31-42. [in Persian]
- [9] Szaraz P, Gratch YS, Iqbal F, Librach CL. In vitro differentiation of human mesenchymal stem cells into functional cardiomyocyte-like cells. *J Vis Exp* 2017; (126): e55757.
- [10] Paige SL, Plonowska K, Xu A, Wu SM. Molecular regulation of cardiomyocyte differentiation. *Circ Res* 2015; 116(2): 341-53.
- [11] Sun X, Li H, Zhu Y, Xu P, Zuo Q, Li B, et al. 5-Azacytidine-Induced Cardiomyocyte Differentiation of Very Small Embryonic-Like Stem Cells. *Stem Cells Int* 2020; 2020: 5162350.
- [12] Wang J, Greene SB, Bonilla-Claudio M, Tao Y, Zhang J, Bai Y, et al. Bmp signaling regulates myocardial differentiation from cardiac progenitors through a MicroRNA-mediated mechanism. *Dev Cell* 2010; 19(6): 903-12.
- [13] Alfar EA, El-Armouche A, Guan K. MicroRNAs in cardiomyocyte differentiation and maturation. Oxford University Press; 2018.
- [14] Katz MG, Farnoli AS, Kindle AP, Hajjar RJ, Bridges CR. The role of microRNAs in cardiac development and regenerative capacity. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2016; 310(5): H528-H41.
- [15] Wang Q, Xu C, Zhao Y, Xu Z, Zhang Y, Jiang J, et al. miR-26b-3p regulates human umbilical cord-derived mesenchymal stem cell proliferation by targeting estrogen receptor. *Stem Cells Dev* 2016; 25(5): 415-26.
- [16] Leeper NJ, Raiesdana A, Kojima Y, Chun HJ, Azuma J, Maegdefessel L, et al. MicroRNA-26a is a novel regulator of vascular smooth muscle cell function. *J Cell Physiol* 2011; 226(4): 1035-43.
- [17] Sun J, Yan P, Chen Y, Chen Y, Yang J, Xu G, et al. MicroRNA-26b inhibits cell proliferation and cytokine secretion in human RASF cells via the Wnt/GSK-3β/β-catenin pathway. *Diagn Pathol* 2015; 10(1): 1-9.
- [18] Dill H, Linder B, Fehr A, Fischer U. Intronic miR-26b controls neuronal differentiation by repressing its host transcript, ctdsp2. *Genes Dev* 2012; 26(1): 25-30.
- [19] Icli B, Wara A, Moslehi J, Sun X, Plovie E, Cahill M, et al. MicroRNA-26a regulates pathological and physiological angiogenesis by targeting BMP/SMAD1 signaling. *Circ Res* 2013; 113(1): 1231-41.
- [20] Luo X, Pan Z, Shan H, Xiao J, Sun X, Wang N, et al. MicroRNA-26 governs profibrillatory inward-rectifier potassium current changes in atrial fibrillation. *J Clin Invest* 2013; 123(5): 1939-51.
- [21] Wang D, Liu C, Wang Y, Wang W, Wang K, Wu X, et al. Impact of miR-26b on cardiomyocyte differentiation in P19 cells through regulating canonical/non-canonical Wnt signalling. *Cell Prolif* 2017; 50(6): e12371.
- [22] Xu W, Zhang X, Qian H, Zhu W, Sun X, Hu J, et al. Mesenchymal stern cells from adult human bone marrow differentiate into a cardiomyocyte phenotype in vitro. *Exp Biol Med (Maywood)* 2004; 229(7): 623-31.
- [23] Tirosh-Finkel L, Zeisel A, Brodt-Ivenshitz M, Shamai A, Yao Z, Seger R, et al. BMP-mediated inhibition of FGF signaling promotes cardiomyocyte differentiation of anterior heart field progenitors. *Development* 2010; 137(18): 2989-3000.
- [24] Rowton M, Guzzetta A, Rydeen AB, Moskowitz IP. Control of cardiomyocyte differentiation timing by intercellular signaling pathways. *Semin Cell Dev Biol* 2021; 118: 94-106.
- [25] Guo Y, Pu WT. Cardiomyocyte maturation: new phase in development. *Circulation research*. 2020; 126(8): 1086-106.
- [26] Buikema JW, Zwetsloot P-PM, Doevedans PA, Domian IJ, Sluijter JP. Wnt/β-catenin signaling during cardiac development and repair. *J Cardiovasc Dev Dis* 2014; 1(1): 98-110.
- [27] Mu F, Huang J, Xing T, Jing Y, Cui T, Guo Y, et al. The Wnt/β-catenin/Lef1 pathway promotes cell proliferation at least in part through direct upregulation of miR-17-92 cluster. *Front Genet* 2019; 10: 525.
- [28] Marvin MJ, Di Rocco G, Gardiner A, Bush SM, Lassar AB. Inhibition of Wnt activity induces heart formation from posterior mesoderm. *Genes Dev* 2001; 15(3): 316-27.
- [29] Hiroi Y, Kudoh S, Monzen K, Ikeda Y, Yazaki Y, Nagai R, et al. Tbx5 associates with Nkx2-5 and synergistically promotes cardiomyocyte differentiation. *Nat Genet* 2001; 28(3): 276-80.
- [30] Snyder M, Huang XY, Zhang JJ. Stat3 directly controls the expression of Tbx5, Nkx2. 5, and GATA4 and is essential for cardiomyocyte differentiation of P19CL6 cells. *J Biol Chem* 2010; 285(31): 23639-46.