مقایسه فعالیت و مشخصات سینتیکی آنزیم لاکتات دهیدروژناز استخراج شده از کاردیومیوسیت‌های مشتق از سلول‌های بنیادی جنینی موش و کاردیومیوسیت‌های نوزاد موش

رزیتا زنوزی M.Sc.[☆☆]، سعید کاظمی آشتیانی Ph.D.[☆]، سامان حسینخانی Ph.D.[☆]، حسین بهاروند Ph.D.[☆۞]

☆ دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، گروه زیست‌شناسی

☆ پژوهشکده رویان، گروه سلولهای بنیادی

۞ دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پایه، گروه بیوشیمی

آدرس مکاتبه: تهران، صندوق پستی: ۴۶۴۴-۱۹۳۹۵، پژوهشکده رویان، گروه سلولهای بنیادی

پست الکترونیک: Email: Baharvand50@yahoo.com

چکیده

دریافت مقاله: ۸۳/۱۲/۱۲، پذیرش مقاله: ۸۴/۴/۲۵

هدف: مقایسه فعالیت و مشخصات سینتیکی آنزیم لاکتات دهیدروژناز استخراج شده از کاردیومیوسیت‌های مشتق از سلول‌های بنیادی جنینی موش و کاردیومیوسیت‌های نوزاد موش

مواد و روش‌ها: پس از کشت و تمایز سلول‌های بنیادی جنینی به کاردیومیوسیت‌ها و نیز جداسازی کاردیومیوسیت‌ها از قلب نوزاد موش و انجام مطالعات ایمونوسیتوشیمیایی به منظور استخراج آنزیم، سلول‌ها با سونیکاتور، لیز و بررسی مشخصات سینتیکی به کمک روش‌های سنجش آنزیمی انجام شد.

یافته‌ها: تست ایمونوسیتوشیمی وجود و درصد خلوص بالای سلول‌های عضله قلبی را در دو نمونه تأیید کرد. پس از مشاهده فعالیت آنزیم به روش اسپکتروفوتومتری، ثابتهای سینتیکی برای سوبسترای NAD^+ در دو نمونه محاسبه شد. در کاردیومیوسیت‌های مشتق ازسلول‌های بنیادی جنینی فعالیت ویژه (Specific activity) ۱۶/۷۸±۱/۰۲ $\mu mol\ min^{-1}\ mg^{-1}$ و K_m برابر ۰/۳۷±۰/۰۳ و در سلول‌های عضله قلبی نوزاد موش فعالیت ویژه ۲۹/۴۱±۱/۸۷ $\mu mol\ min^{-1}mg^{-1}$ و K_m برابر ۰/۶۹±۰/۰۴ (r^2>۰/۹۵) به دست آمد. pH بهینه هر دو نمونه در واکنش رفت برابر ۸ بوده و بیشترین میزان فعالیت ویژه آنزیم حاصل از سلول‌های بنیادی در دمای ۶۵درجه سانتی‌گراد و نمونه طبیعی در دمای ۶۰درجه سانتی‌گراد به دست آمد.

نتیجه گیری: در این مقایسه اختلاف در خصوصیات سینتیکی دو نمونه مشاهده شد.

کلیدواژگان: سلول‌های بنیادی جنینی، لاکتات دهیدروژناز، سینتیک، سلول قلبی، موش

فصلنامه پزشکی یاخته، سال هفتم، شماره۳، پاییز ۸۴، صفحات ۱۵۱-۱۴۶

مقدمه

لاکتات دهیدروژناز (L-Lactate: NAD^+ Oxidoreductase, EC:1,1,1,27; LDH) یک آنزیم سیتوپلاسمی است که نقش مهمی در تنظیم گلیکولیز بی‌هوازی دارد و اکسیداسیون L-Lac به پیروات را با واسطه NAD^+ به عنوان پذیرنده هیدروژن کاتالیز می‌کند. الکتروفورز روی انواع ژل نشان داده که این آنزیم دارای حداقل ۵ ایزوفرم تترامر بوده که از دو نوع زیر واحد تشکیل شده است، که ژن‌های مستقلی مسئول بیان آنها هستند و اختلافشان در نوع و توالی برخی از اسیدهای آمینه است. M زیر واحد ماهیچه‌ای و H زیر واحد قلبی است (۱، ۲). این ایزوفرم‌ها در خواص شیمی فیزیکی، ایمونولوژیکی و فیزیولوژیکی متفاوت هستند (۳، ۴). به طورمثال K_m ایزوفرم ماهیچه‌ای از قلبی بیشتر است. ایزوفرمهای LDH حاصل از ترکیب تصادفی زیرواحدها نیستند، بلکه تفاوت درخواص زیرواحدها و تشکیل ایزوفرم‌های مختلف در بافت‌های مختلف به دلیل وجود عملکرد فیزیولوژیکی متفاوتی است که این بافت‌ها به آن نیازمندند (۵). LDH_1 (H_4) و LDH_2 (H_3M) بیشتر واجد زیر واحد H هستند و در قلب و سلول‌های خونی (RBCs) یعنی مکانی که پیروات از طریق چرخه کربس اکسید می‌شود، وجود دارند. LDH_4 (HM_3) و LDH_5 (M_4) بیشتر دارای زیرواحد M بوده و تجمع سریع لاکتات را سبب می‌شوند و در ماهیچه اسکلتی که گلیکولیز بی‌هوازی انجام می‌شود وجود دارند (۴). در واقع جهت‌گیری ایزوفرم‌ها به سمت بافت‌های مختلف، پاسخی به شرایط موجود در آن بافت، مانند کمبود اکسیژن یا کمبود سوبسترا است (۶). مثلا در تکامل قلب جنین به بالغ، هم‌زمان با تکامل میتوکندری‌ها و گرایش به سمت تنفس هوازی، میزان ایزوفرم H4 افزایش می‌یابد (۷). همچنین در حملات قلبی که از علل شایع آن کمبود سوبسترا و اکسیژن در بافت است، افزایش این ایزوفرم مشاهده شده است.

بیشتر مطالعات در مورد آنزیم LDH، روی نمونه‌هایی بوده که در بدن موجود زنده تولید شده است، بنابراین در این مطالعه به بررسی این آنزیم در کاردیومیوسیت‌های تمایز یافته از سلول‌های بنیادی

جنینی (Es: Embryonic stem cells) در محیط آزمایشگاهی پرداخته شد.

سلول‌های بنیادی جنینی، سلول‌های تمایز نیافته و پرتوانی (pluripotent) هستند که از توده سلولی داخلی بلاستوسیست‌ها مشتق می‌شوند (۸، ۹). از جمله ویژگی‌های این سلول‌ها، قدرت تکثیر فراوان، ظرفیت نامحدود نوسازی (self renewal)، تمایز به تمام سلول‌های بدنی و سلول‌های زاینده (germ line)، فعالیت بالای آلکالین فسفاتازی، بیان آنتی‌ژنهای خاص و فاکتور رونویسی Oct-4، نسبت هسته به سیتوپلاسم بالا و فعالیت تلومرازی بالا است (۱۰). سلول‌های بنیادی جنینی در شرایط آزمایشگاهی می‌توانند به سلول‌های مختلفی متمایز شوند از جمله سلول‌های عصبی (۱۱، ۱۲)، قلبی (۱۳، ۱۴)، اندوتلیالی (۱۵، ۱۶)، سلول‌های کبدی (۱۷)، سلول‌های غضروفی (۱۸)، ماهیچه صاف (۱۶)، سلول‌های چربی (۱۹) و غیره.

تمایز سلول‌های بنیادی جنینی به سلول‌های مختلف به طور خودبه‌خودی بوده و تحت تأثیر برخی القاءکننده‌ها تشدید می‌شود که این تمایز تشدید شده بستگی به فاکتور مورد استفاده دارد (۲۰).

به دلیل پرتوانی و سایر خصوصیات منحصر به فرد، این سلول‌ها در زیست‌شناسی تکوینی، مطالعه اثر داروها و فاکتورهای محیطی برتمایز و عملکرد سلول در طب پیوند کاربردهای فراوانی دارند (۱۰، ۲۰). از جمله سلول‌هایی که از سلول‌های بنیادی جنینی متمایز می‌شوند، سلول‌های عضله قلبی هستند که خصوصیات مورفولوژی و فراساختاری (۲۱)، الکتروفیزیولوژی (۱۳، ۲۲)، فارماکولوژی (۲۰)، تجلی ژن‌های خاص قلبی در سطح RT-PCR و ایمونوسیتوشیمی قبلا نشان داده شده است (۲۲، ۲۳). به طوری که دیده شده این کاردیومیوسیت‌ها از نظر فراساختاری بالغ بوده و پتانسیل عمل تولید می‌کنند. همچنین به آگونیست‌ها و آنتاگونیست‌های کولینرژیک و آدرنرژیک پاسخ می‌دهند (۲۴). اما تاکنون در مورد فعالیت آنزیمی کاردیومیوسیت‌های مشتق از سلول‌های بنیادی جنینی مطالعه‌ای گزارش نشده است. لذا در این مطالعه، فعالیت و مشخصات سینتیکی آنزیم لاکتات دهیدروژناز استخراج شده از سلول‌های قلبی تمایز یافته از سلول‌های بنیادی جنینی موش در روز ۱۰+۷ که آغاز مرحله پایانی (۲۰، ۲۲) (terminal) از تمایز سلول‌های بنیادی به کاردیومیوسیت‌هاست با لاکتات دهیدروژناز حاصل از سلول‌های قلبی نوزاد ۴-۲ روزه موش مقایسه شد.

مواد و روش‌ها

کشت سلول‌های بنیادی جنینی

ابتدا سلول‌های بنیادی جنینی (Royan B1) (۲۵) مشتق از موش نژاد C57BL/6 روی لایه سلولی تغذیه کننده که از سلول‌های فیبروبلاستی موش به دست آمده در محیط ذیل کشت شدند:

Knockout Dulbecco's modified Eagle's medium (KO-DMEM) (Gibco:10029-018) 0.1 mM Beta-Mercapto ethanol (Sigma:M-7522), Pen/strep (Gibco: 12800-116)15% fetal calf serum (FCS) (Gibco: 10270-106), 0.1mM non - essential amino acid (Gibco: 11140-035), 1000IU/ml leucemia Inhibitory factor (Chemicon, ESGRO), 2mML-Glutamin (Sigma:G-5763)

تمایز سلول‌های بنیادی جنینی به سلول‌های عضله قلبی

تعداد ۸۰۰ سلول بنیادی جنینی در هر قطره ۲۰ میکرولیتر از محیط کشت بدون LIF به صورت آویزان (hanging drop) در درب پتری دیش کشت شدند. به سلول‌ها دو روز فرصت داده شد تا تجمع حاصل کرده و اجسام شبه جنینی (Ebs: Embryonic body) تشکیل شود. در ادامه اجسام شبه جنینی به مدت ۵ روز در سوسپانسیون سلولی حاوی محیط KO-DMEM قرار داده شد و در روز هفتم اجسام شبه جنینی به ظروف کشت شش خانه که با ژلاتین ۰/۱ درصد (Sigma: G-2500) ژلاتینه شده، منتقل و در انکوباتور CO_2 ۵درصد انکوبه شد. ده روز بعد یعنی در روز ۱۰+۷ کاردیومیوسیت‌های در حال ضربان به وسیله پیپت پاستور در زیر میکروسکوپ فاز کنتراست (Nikon) جدا شدند.

استخراج سلول‌های قلبی از نوزاد موش

سلول‌های عضله قلبی با تغییر در روش Chlopcikova و همکاران (۲۶) از قلب نوزاد موش جداسازی شد. بدین ترتیب که ابتدا قلب‌های نوزاد ۴-۲ روزه موش نژاد NMRI جدا شده و در بافر ۴ درجه سانتی‌گراد شامل مواد ذیل شستشو داده شد:

20mM HEPES (Sigma: H-7006), 1mM NaH_2PO_4 (Sigma: P-5011), 120mM Nacl (Sigma: S-5886), 5.4mM KCl (Sigma: P-5405), 5.5mM Glucose (Sigma: G-6152) 0.8mM $MgSO_4$ (Sigms: M2643)

در pH=۷/۴. سپس قلب‌ها را دو بار از سر سوزن 18G عبور داده و نمونه حاصل را با محلول هپارین ۰/۱۶ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در PBS^-(Phosphate Buffer Saline) (Gibco: 21600-010) شستشو داده تا رگ‌ها و سلول‌های خونی زدوده شود و سپس نمونه حاصل به بافر تریپسین ۰/۲ درصد اضافه شده و در ۳۷درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه تکان داده شد. سپس محلول حاصل را بیرون ریخته و به نمونه محلول تازه افزوده شد و مجددا به مدت ۲۰ دقیقه در حرارت ۳۷درجه سانتی‌گراد تکان داده شدند. این عمل تا هضم کامل سلول‌های موردنظر ادامه داده شد. محلول به دست آمده به مدت ۲۰ دقیقه در دور ۱۸۰۰ سانتریفوژ شده و رسوب حاصل در محیط کشت ذیل مخلوط شد.

13.5g/lit DMEM (Gibco: 12800-116), pen/strep (Gibco-15070-063), 3.7g $NaHCO_3$ (sigma: S-5761), 7µl Beta mercapto Ehtanol (Sigma-M-7522), 15% fetal calf serum (Gibco:1027-106), 1% L-Glutamin (Sigma: G-5763) 1% non-essential amino acid (Gibco: 11140-035)

و در ادامه با استفاده از شیب پرکل (Biochrom AG:L6143) در ۱/۰۶۲ و ۱/۰۸۲، درصد خلوص سلول‌های قلبی بالا برده شد و بعد از

شستشو نمونه به فلاسک ژلاتینه منتقل و ۱/۵ ساعت انکوبه شد تا سلول‌های غیرقلبی به کف فلاسک بچسبند. در ادامه محلول رویی به مدت ۲۰ دقیقه در دور ۱۸۰۰ سانتریفوژ شد و رسوب حاصل با PBS^- شستشو داده و تا موقع مصرف در ازت مایع نگهداری شد.

تست ایمونوسیتوشیمی

پس از جداسازی سلول‌های قلبی تمایز یافته و طبیعی به روش‌های ذکر شده، نمونه‌ها در محلول PBS^- تریپسینه شدند تا به صورت سلول‌های منفرد درآیند. سپس مجددا کشت شدند و بعد از دو روز برای ایمونوسیتوشیمی رنگ‌آمیزی شدند. ابتدا سلول‌ها دوبار با PBS^- شسته شدند. سپس با محلول متانول: استن (۳ به ۱) در ۲۰-درجه سانتی‌گراد و یا پارافرمالدیید ۴درصد در دمای اتاق تثبیت شدند. به دنبال شستشوی مجدد سلول‌ها با PBS^-، سلول‌ها با سرم ۱۰ درصد بز به مدت ۳۰ دقیقه پوشانده شدند. آنتی آلفا اکتینین (Sigma: A-7811) با غلظت (۱:۸۰۰) به مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۳۷درجه سانتی‌گراد به نمونه‌ها افزوده شد در ادامه سلول‌ها سه بار با PBS^- (هر بار ۱۰ دقیقه) شسته شده و به دنبال آن آنتی بادی ثانویه نشان‌دار با FITC (Sigma: F-9006) اضافه (۱۰۰: ۱) و به مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۳۷درجه سانتی‌گراد قرار داده شد.

در انتها سلول‌ها سه بار با PBS^- شستشو و با میکروسکوپ فلورسنس بررسی شدند.

آماده‌سازی نمونه برای سنجش آنزیمی

برای پایداری هر چه بیشتر آنزیم و کم کردن فعالیت پروتئازها سلول‌های قلبی حاصل از دو نمونه در بافر PBS^- شامل:

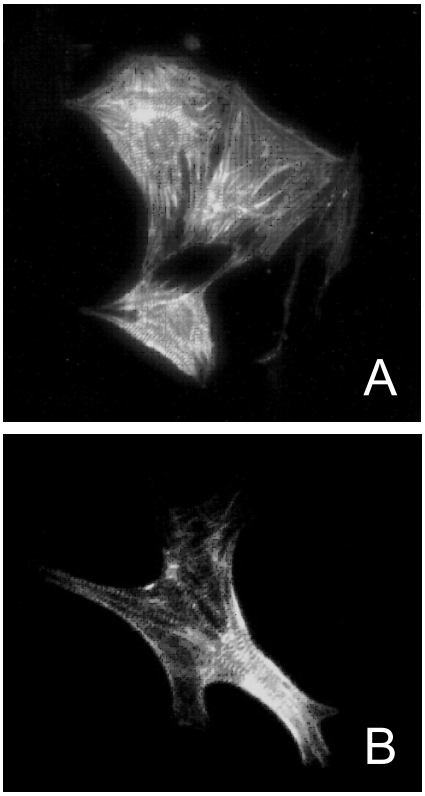
0.5mM PMSF (Phenyl methane solfonyl fluride) (Sigma: p-7626) و (10mM Beta mercapto ethanol (Sigma: M-7522)

قرار داده شد و به منظور استخراج آنزیم از سلول، کاردیومیوسیت مشتق از سلول‌های بنیادی در ۱/۸ میکرومتر در ۸ مرحله به مدت ۳۰ ثانیه و نمونه حاصل از سلول‌های قلب موش در ۲میکرومتر در ۸ مرحله با سونیکاتور به مدت ۳۰ ثانیه لیز شده و در ادامه هر دو نمونه در ۴درجه سانتی‌گراد در دور ۱۴۰۰۰ سانتریفوژ و محلول رویی برای کار جدا شد. در مطالعه ویژگی‌های سینتیکی، سعی شد فاکتورهای مؤثر در سرعت واکنش نظیر دما، pH و نیز غلظت آنزیم ثابت گرفته شود (۳۰ درجه سانتی‌گراد =T و ۸=pH). بنابراین با انجام سه گروه آزمایش با نمونه‌های حاصل از کشت‌های مختلف سلول‌های بنیادی جنینی و سلول‌های استخراج شده از قلب موش و سه بار تکرار هر نمونه مشخص شد که در یک غلظت پروتئین ثابت، غلظت آنزیم با توجه به مقادیر dA/min به دست آمده، نسبتا ثابت است. فعالیت آنزیم در غلظت ۵۵mM لاکتات (Sigma: L-2250) و NAD^+ 7mM (Sigma: N-4256) در بافر ۰/۲M Tris-Hcl (Sigma: T-8529) در طول موج ۳۴۰ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر (شیمادزو) به دست آمد. ثابت‌های سینتیکی آنزیم با ثابت نگه داشتن غلظت لاکتات و تغییر در غلظت NAD^+ به عنوان سوبسترای واکنش در دمای ۳۰درجه سانتی‌گراد و pH=۸ به دست آمد. علاوه بر این pH و دمای بهینه برای هر دو نمونه تعیین شد.

یافته‌ها

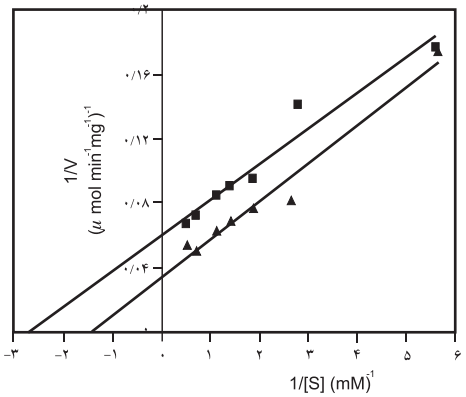
بعد از استخراج سلول‌های قلبی و انجام تست ایمونوسیتوشیمی هر دو نمونه، مشاهده خطوط Z موجود در میوفیبریلها نشان داد که نشان‌گر آلفا- اکتینین در این سلول‌ها بیان شده است. علاوه بر این ساختار سارکومری و مخطط سلول‌ها، وجود سلول‌های ماهیچه‌ای ودرصد خلوص بالای آنها را اثبات کرد (شکل ۱ الف و ب).

در کاردیومیوسیت‌های مشتق از سلول‌های بنیادی میزان فعالیت ویژه آنزیم mM برابر NAD^+ برای K_m ۱۶/۷۸±۱/۰۲$\mu mol\ min^{-1}mg^{-1}$ و ۰/۳۷ ±۰/۰۳ و در کاردیومیوسیت‌های موش میزان فعالیت ویژه آنزیم mM ۰/۶۹±۰/۰۴ برابر K_m و ۲۹/۴۱±۱/۸۷$\mu mol\ min^{-1}mg^{-1}$ به دست آمد (r^2>۰/۹۵) نمودار لاین و یور برک آنها (Line-weaver Burk) در نمودار ۱ نمایش داده شده است. میزان فعالیت ویژه آنزیم در واکنش رفت برای سوبسترای NAD^+ در دو نمونه در درجه حرارت‌های مختلف طبق نمودار ۲ بررسی شد و دمای بهینه برای آنزیم استخراج شده از کاردیومیوسیت‌های مشتق از سلول‌های بنیادی برابر ۶۵ درجه سانتی‌گراد و برای آنزیم استخراج شده از کاردیومیوسیت‌های موش برابر ۶۰درجه سانتی‌گراد به دست آمد.

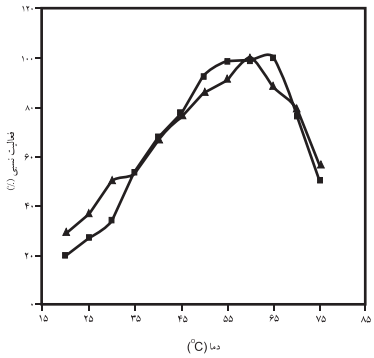


شکل ۱: (الف) ایمونوسیتوشیمی کاردیومیوسیت‌های مشتق از سلول‌های بنیادی جنینی، (ب) کاردیومیوسیت‌های طبیعی موش ۲ روزه

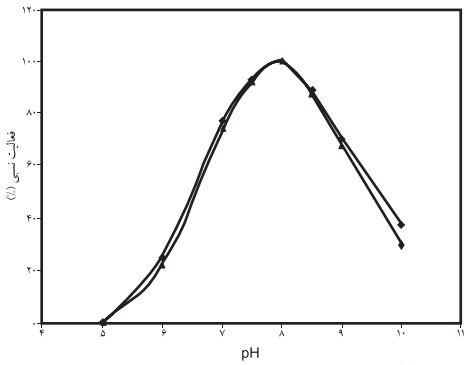
(مشاهده نمونه رنگی شکل در انتهای مقالات)



نمودار ۱: نمودار Line-Weaver Burk لاکتات دهیدروژناز حاصل از کاردیومیوسیت‌های مشتق از سلول‌های بنیادی جنینی (■) و طبیعی (▲).



نمودار ۲: نمودار دمای بهینه لاکتات دهیدروژناز حاصل از کاردیومیوسیت‌های مشتق از سلول‌های بنیادی جنینی (■) و طبیعی (▲). در واکنش تبدیل لاکتات به پیروات در بافرتریس و pH=۸



نمودار pH بهینه لاکتات دهیدروژناز حاصل از کاردیومیوسیت‌های مشتق از سلول‌های بنیادی جنینی (■) و طبیعی (▲). در واکنش تبدیل لاکتات به پیروات در بافرتریس و دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد

بررسی فعالیت ویژه آنزیم در pHهای مختلف در واکنش رفت برای سوبسترای NAD^+ برای هر دو نمونه طبق نمودار ۳ نشان داد که pH بهینه برای این واکنش برابر ۸ است.

بحث

توان بالای کاردیومیوسیت‌های مشتق از سلول‌های بنیادی جنینی در ترمیم عضله قلب در مدل‌های حیوانی نشان داده شده است (۲۸) مطالعات بسیاری روی ویژگی‌های فیزیولوژی (۲۲، ۱۳)، فارماکولوژی (۲۰)، مورفولوژی و فراساختار (۲۱) این سلول‌ها انجام شده است. مقایسه فراساختار کاردیومیوسیت‌های تمایز یافته طی مراحل تکوین با سلول‌های عضله قلبی نوزاد موش دو روزه بررسی شده است (۲۷).

خصوصیات سینتیکی آنزیم لاکتات دهیدروژناز در برخی بافت‌ها مانند کبد (۴، ۲۹)، قلب (۳۰، ۳۱، ۳۲، ۳۳)، غدد جنسی (۳۴) (Testis) و عضله (۳۵) و نیز در جانداران مختلف مانند پستانداران (۳۰، ۳۱، ۳۲، ۳۳)، خزندگان (۴)، ماهیها (۲۹)، باکتری‌ها (۳۶) و مخمر (۳۷) مورد مطالعه قرار گرفته است. بنابراین مطالعه ویژگی‌های بیوشیمیایی این سلول‌ها، از جمله بررسی خصوصیات سینتیکی آنزیم‌های نشان‌گر (Marker) سلول‌های قلبی مشتق شده از سلول‌های بنیادی جنینی موش، مانند لاکتات دهیدروژناز لازم به نظر رسید. طبق مطالعات ما تا کنون گزارشی در این مورد داده نشده است.

در مطالعه حاضر بر روی عصاره استخراج شده از سلول پرداخته شد تا با مطالعات بعدی و خالص سازی آنزیم، میزان اثر عوامل محیطی و سیتوپلاسمی عملکرد، ساختار و بر هم‌کنش‌های آنزیم بررسی شود. در بررسی تصاویر حاصل از تست ایمونوسیتوشیمی دو نمونه، تشابه زیادی از نظر ساختارهای سارکومری سلول‌های ماهیچه‌ای و خطوط Z مشاهده شد که این نتیجه در سایر مطالعات هم گزارش شده است (۲۷).

در مطالعه ویژگی‌های سینتیکی، آنزیم LDH استخراج شده از هر دو نمونه فعالیت مطلوبی داشت که مطالعات قبلی در زمینه سلول‌های قلبی طبیعی، این مساله را تایید می‌کند (۳۰، ۳۱، ۳۳). در کاردیومیوسیت‌های مشتق شده از سلول‌های بنیادی فعالیت ویژه آنزیم برای NAD^+ ۱۶/۷۸±۱/۰۲ $\mu mol\ min^{-1}mg^{-1}$ و K_m برابر ۰/۳۷±۰/۰۳ mM و در کاردیومیوسیت‌های طبیعی فعالیت ویژه آنزیم برای NAD^+ ۲۹/۴۱±۱/۸۷ $\mu mol\ min^{-1}mg^{-1}$ و K_m برابر ۰/۶۹±۰/۰۴ mM بود (r^2>۰/۹۵).

یوشیکیونی و همکاران (۳۳) میزان K_m در قلب رت را ۰/۶۱ mM و در سرم انسان ۰/۵۶ mM گزارش کرده‌اند و درسایر مطالعات (۳۲) روی آنزیم کریستالین که از قلب گوساله به دست آمده میزان K_m و ۰/۱ mM گزارش شده است. K_m هر آنزیم در واقع بیان‌گر غلظت فیزیولوژیکی سوبسترای آن آنزیم در سلول است (۳۹). کمتر بودن میزان K_m آنزیم حاصل از سلول‌های عضله قلبی مشتق از سلول‌های بنیادی جنینی نسبت به نمونه طبیعی نشانه میل ترکیبی (affinity) بیشتر این آنزیم به سوبسترا است که با توجه به تعریف K_m یک آنزیم در واقع به علت شرایط متابولیکی موجود، که ناشی از سیر تکاملی در بافت است تغییر در جایگاه فعال (active site) آنزیم را برای استفاده بهینه از سوبسترای موجود سازگار می‌کند و کمپلکس حد واسط (ES) پایدارتری تشکیل می‌دهد. کمتر بودن میزان فعالیت ویژه آنزیم حاصل از کاردیومیوسیت‌های مشتق از سلول‌های بنیادی جنینی می‌تواند ناشی از کاهش بیان ژن آنزیم، اختلاف در بیان فرم‌های ایزوآنزیمی در این سلول‌ها و یا کم بودن فرم فعال آنزیم در داخل سلول، به دلیل مراحل خاص تکاملی در شرایط آزمایشگاهی (in vitro) که متفاوت از مراحل

تکوین در بدن موجود زنده (in vivo) است باشد. چرا که تغییر در تنظیم ژن اساسا عنصر مهمی است که از تغییرات تکاملی ناشی می‌شود. بیشترین میزان فعالیت ویژه آنزیم موجود در کاردیومیوسیت‌های مشتق از سلول‌های بنیادی جنینی در بافر تریس و pH=۸ در دمای ۶۵درجه سانتی‌گراد و در سلول‌های قلبی طبیعی در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد به دست آمد که در مطالعات گذشته نیز فعالیت مطلوب آنزیم در ۶۰درجه سانتی‌گراد گزارش شده است (۴۰). این نتیجه نشان دهنده پایدارتر بودن ساختار سه بعدی آنزیم حاصل از سلول‌های بنیادی جنینی در مقایسه با سلول‌های طبیعی بوده و نشان می‌دهد که آنزیم برای داشتن بالاترین فعالیت به دمای بالاتری جهت ایجاد حداکثر انعطاف پذیری (flexiblity) در ساختمان خود نیاز دارد.

علاوه بر این می‌توان به نقش عوامل سیتوپلاسمی در پایداری آنزیم‌ها اشاره کرد. چرا که حتی با مقایسه تاثیر این عوامل بر دمای بهینه آنزیم خالص و آنزیم موجود در محلول‌های استخراج شده نیز می‌توان شواهدی مبنی بر پایداری کمتر آنزیم‌های خالص مشاهده کرد.

در دمای ۳۰درجه سانتی‌گراد و بافر تریس بیشترین میزان فعالیت ویژه هر دو نمونه در pH=۸ مشاهده شد که وینر و همکاران (۳۲) pH بهینه را در ۹ و یوشیکیونی و همکاران (۳۴) این کمیت را در قلب رت ۷/۵۷ و در سرم انسان ۷/۴۳ گزارش کرده‌اند که این نتیجه می‌تواند بیانگر عدم تغییر در pK گروه‌های کاتالیتیک دهانه فعال آنزیم باشد چرا که آمینواسیدهای موجود در دهانه فعال آنزیم تحت pH خاصی که متناسب با بار آنها است عمل می‌کنند و مطالعه روی وابستگی آنزیم به pH به ما نشان می‌دهد که چه آمینواسیدهایی در کاتالیز واکنش شرکت دارند (۴۱). در بسیاری از مطالعات، نتایج حاصل از بیان ژن، الکتروفیزیولوژی و مورفولوژی سلول‌های قلبی مشتق از سلول‌های بنیادی جنینی، مشابه سلول‌های قلبی طبیعی (in vivo) در مرحله ابتدایی (early) تکوین قلب است (۲۳). با در نظر گرفتن این موضوع، نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که با توجه به شرایط تکاملی موجود در سلول‌های قلبی مشتق از سلول‌های بنیادی آنزیم LDH موجود در این بافت عملکردهای سینتیکی خود را به گونه‌ای تنظیم می‌کند که سلول با شرایط موجود، سازگاری بیشتری داشته باشد.

نتیجه گیری

این مطالعه از این جهت مهم است که آنزیم LDH از جمله آنزیم‌های نشانگر و متابولیک در سلول‌های قلبی است و اطلاعات زیادی را از نظر وضعیت متابولیکی و همچنین بیان ژنهای مختلف در داخل سلول در اختیار ما می‌گذارد. وضعیت متابولیکی کاردیومیوسیت‌های مشتق شده از سلول‌های بنیادی جنینی یکی از مهم‌ترین جنبه‌های عملی استفاده از این سلول‌ها جهت جایگزینی سلول‌های طبیعی در فرآیندهایی نظیر پیوند سلول‌های قلبی و سایر مطالعات است. بنابراین محققان درصدد ایجاد شرایطی مناسب برای تولید سلول‌های قلبی بالغ از سلول‌های بنیادی جنینی هستند.

در انتها لازم به ذکر است که بررسی فرم‌های مختلف ایزوآنزیمی LDH در دو نمونه با استفاده از روش ایزوالکتریک فوکوسینگ (IEF electrophoresis)، همچنین بیان ژن‌های فوق با استفاده از روش‌های زیست‌شناسی مولکولی نظیر RT-PCR از جمله فعالیت‌های قابل انجام و مکمل این تحقیق می‌باشد.

تقدیر و تشکر

این مقاله حاصل بخشی از طرح (کد: ۳-۱-۱۳۷) تمایز سلول‌های بنیادی جنینی به کاردیومیوسیت است و هزینه آن توسط پژوهشکده رویان پرداخت شده است. نویسندگان مقاله بر خود فرض می‌دانند که از همکاری صمیمانه معاونت پژوهشی پژوهشکده رویان تشکر و قدردانی نمایند.

Refrences

1. Wieland T, Pfleiderer G: Demonstration of the heterogenecity of lactic aciddehydrogenase of varius origins by carrier electrophoresis. Biochem. Z 1957; 392: 112

2. Kaplan NO: Lactate dehydrogenase- structure and function. Broukhaven Symp Biol.1964; 17: 131-153.

3. Wilson AC, Kaplan NO, Levine L, Pesce A, Reichlin M and Allison WS. Evaluation oflactic dehydrogenase. Fed Proc 1964; 23: 1258-1266

4. Javed MH, Azimuddin SM, Hussain A, Ahmed A, Ishaq M: Characterization of lactatedehydrogenase from varanus liver. Experimental and Molecular Medicine 1997; 29: 25-30

5. Kaplan NO: Effect of hormones and environmental factors on lactic dehydrogenase. JCell Comp Physiol 1965; 66: 1

6. Mc Clelland GB, Brooks GA: Changes in MCT1, MCT4 and LDH expression are tissue specific in rats after long-term hypobaric hypoxia. J Appl physiol 2002; 92: 1573-1584

7. Hinks M, Master CJ: The epigenetic control of lactate dehydrogenase biosynthesis. Life sci. 1965; 4: 679-703

8. Evans MJ, Kaufman MH: Establishment in culture of pluripotent cells from mouseembryos. Nature 1981; 292: 154-156

9. Martin GR: Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured inmedium conditioned by teratocarcinoma stem cell. Proc Natl Acad Sci USA 1981; 78:7634-7638

10. Wobus AM: Potential of embryonic stem cell. Molecular Aspects of Medicine 2001;22: 149-164.

11. Bain G, Kitchens D, Yao M, Huettner JE, Guttieb DL: Embryonic stem cell expressneuronal properties. Dev Biol 1995; 168: 342-357

12. Strubing C, Ahnert Hilgerr G, Shan J, Wiedenmann

B, Hescheler J, Wobus AM: Differentiation of plurioptent embryonic stem cells into the neuronal lineage neurons.Mech Dev 1995; 53: 275-287
13. Maltsev VA, Rohwedel J, Hescheler J, Wobus AM: Embryonic stem cell differentiatein vitro into cardiomyocytes representing sinusnodal, artial and ventricular cell types.Mech Dev 1993; 44: 41-50
14. Doestchman T, Eistetter H, Katz M,Schmit W, Kemler R: The in vitro development ofblastocyst-derived embryonic stem cell lines: formation of viscerral yolksac, blood islandsand myocardium. J Embryol Exp 1985; 87: 27-45
15. Risau W, Sariola H, Zerwes HG, Sasse J, Ekblam P, Kemler R, Doetschman T: Vasculogenesis and angiogenesis in embryonic- stem cell - derived embryoid bodies. Develop 1988; 102:471-478
16. Yamashita J, Itoh H, Hirashima M, Ogawa M, Nishikawa S, Yurugi T, Naito M, NakaoK, Nishikawa S: FLK 1- Postitive cells derived from embryonic stem cell serve as vascularprogenitors. Nature 2000; 408: 92-96
17. Lumelsky N, Blondel O, Laeng P, Velasca I, Ravin R, McKay R: Differentiation ofembryonic stem cell to insulin-secreting structures similar to pancreatic Islets. Scinece2001; 292: 1389-1394
18. Kramer J, Hegert C, Guan K, Wobus AM, Muller PK, Rohwedel J: Embryonic stemcell - derived chondrogenic differentiation in vitro: activation by BMP-2 and BMP-4. MechDev 2000; 92: 193-205
19. Dani C, Smith AG, Dessolin S, Leroy P, Staccini L, Villageois P, Darimont C, Aihavd C: Differentiation of embryonic stem cell into adipocytes in vitro. J Cel Sci 1997; 110:1279-1285
20. Kenneth R, Czyz J, Tweedle D, Tian Yang H: Differentiation of pluripotent embryonicstem cell into cardiomyocytes. Circulation Research 2002; 91,3: 189-201
21. Hescheler J, Fleischmann BK, Lentini S, Maltsev VA, Rohwedel J, Wobus AM, Addicks K: Embryonic stem cell: a model to study structural and functional properties incardiomyogenesis. Cardiovasc Res 1997; 36: 149-162
22. Maltsev VA, Wobus AM, Rohwedel J, Bader M, Hescheler J: Cardiomyocytesdifferentiated in vitro from embryonic stem cell developmentally express cardiac-spesificgenes and ionic currents. CIrc Res 1994; 75: 233-244
23. Fijnvandraat AC: Cardiomyocytes derived from embryonic stem cells resemblecardiomyocytes of the embryonic heart tube. Cardiovascular Research 2003; 58:399-409
24. Baharvand H, Azarnia M, Parivar K, Ashtiani SK: The effect of extracellular matrix onembryonic stem cell-derived cardiomyocytes. J Mol cell Cardio 2005; in press
25. Baharvand H, Matthaei K: Culture condition difference for establishment of newembryonic stem cell lines from the C57BL/6 and BALB/c mouse strains in vitro cell. DevBiol Animal 2004; 40: 76-81
26. Chlopcikava S: Psotova J, Miketova P, Sousek J. Chemoprotective effect of plantphenolics agains Anthracycline- induced toxicity rat cardiomyocytes part II. Caffeic,Chlorogenic and rosmarinic acids. Phytotherapy Research 2004; 18: 408-413
۲۷) بهاروند ح، روحانی ر، پیریایی ع، طائی ع: مقایسه فراساختار تکوین کاردیومیوسیتهای مشتق از بنیاختههای جنینی موشی باکاردیومیوسیتهای طبیعی. مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد، در دست چاپ ۸۴
28. Min JY: Transplantation of embryonic stem cells improves cardiac function inpostinfacted rats. J Appl Physiol 1992; 288-296
29. Sensabavgh JR, Kaplan NO: Lactate dehydrogenase specific to the liver of gadoidfish. JBC 1972; 247: 585-593
30. Singh SN, Kanungo MS: Alteration in lactate dehydrogenase of the brain, heart,skeletal muscle and liver of rats of various ages. JBC 1968; 243: 4526-4529
31. Van Der Laarse A, Hollar L, Kokshoon LJ, Witteveen S: The activity of cardio-specificisoenzymes of creatine phosphokinase and lactate dehydrogenase in monolayer culturesof neonatal rat heart cell. Journal of Molecular and Cellular Cardiology 1979; 11, 5: 501-510
32. Winer AD, Schwert GW: Lactate dehydrogenase: influence of pH on kinetic. JBC1958; 231: 1065
33. Yoshikoni K, Matsuda T, Xia WL, Nishimura M, Tanishima K: Cold lability of lactatedehydrogenase isoenzymes and the effective preparation of reference material for clinicallaboratory use. Biotechnol Appl Biochem 2001; 34: 167-171
34. Battellino LJ, Jaime FR, Blanco A: Kinetic properties of rabbit testicular lactatedehydrogenase isozyme. JBC 1968; 243, 19: 5185-5192
35. Zewe V, Fromm JH: Kinetic studies of rabbit muscle lactate dehydrogenase. JBC1962; 237: 1668-1675.
36. Gordon GL, Doelle HW: Production of Racemic lactic acid in pediococcus cervisiaecultures by two lactate dehydrogenase. Journal of Bacteriology 1975; 121(2): 600-607
37. Hasegawa H: Kinetic studies on the action of yeast L-lactate dehydrogenase. JBC1962; 52: 207-213.
38. Stryer L: in Biochemistry 4thEd. WH. Freeman and Co, New York; 1995; 92
39. Devlin MD: Text book of biochemistry. Fifth edition. John wiley; 2002: 423
40. Holbrook JJ: In the Enzymes (Boyer, P.D, ed) 3rd Ed. Vol. 11, Academic Press, 1975, 11: 191-292
41. Copeland RA in Enzymes. John Wiley; 2000; 241-248