



## Existence of a delayed rectifier $K^+$ current in the membrane of human embryonic stem cell

Sahar Kiani<sup>1</sup>, Javad Mirnajafi-Zadeh<sup>1\*</sup>, Ebrahim Shahbazi<sup>2,3</sup>, Hossein Baharvand<sup>2,3\*</sup>

1. Dept. Physiology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

2. Dept. Stem Cells and Developmental Biology, Royan Institute for Stem Cell Biology and Technology, ACECR, Tehran, Iran

3. Dept. Developmental Biology, University of Science and Culture, ACECR, Tehran, Iran

Received: 21 May 2010

Accepted: 19 July 2010

### Abstract

**Introduction:** Human embryonic stem cells (hESCs) are pluripotent cells that can proliferate and differentiate to many cell types. Their electrophysiological properties have not yet been characterized. In this study, the passive properties (such as resting membrane potential, input resistance and capacitance) and the contribution of delayed rectifier  $K^+$  channel currents to the membrane conductance of hESCs was investigated.

**Methods:** hESC (Royan H6 line) was used in this study. Cells were cultured with feeder free culture method. To study the electrophysiological properties of these cells, we used whole cell patch clamp technique in a voltage clamp mode. Ionic currents were recorded by stimulating the cells with depolarizing steps from -90 mV to +50 mV. For pharmacological determination of these currents, potassium channel blockers such as tetraethyl ammonium (TEA; a delayed rectifier  $K^+$  channel blocker) and 4-aminopyridine (4-AP; as an A-type  $K^+$  channel blocker) were used.

**Results:** The resting membrane potential of hESCs was  $-8.66 \pm 0.87$  mV, the input resistance was  $11.943 \pm 0.23$  M $\Omega$  and the membrane capacitance was  $1.46 \pm 0.55$  nF. In voltage clamp experiments, some outward currents were recorded in hESCs that were progressively increased with positive voltages. These outward currents were inhibited by TEA but not 4-AP. These channels did not show inactivation and their current were recorded from -60 mV. The mean conductance of these channels was  $11.81 \pm 0.45$  pS at -60 mV and  $141.4 \pm 10.97$  pS at +50 mV. There were no inward currents in hESCs.

**Conclusion:** These data show that hESCs have special electrophysiological properties. There are voltage dependent delayed rectifier  $K^+$  currents in these cells that are sensitive to TEA but not 4-AP.

**Key words:** Human embryonic stem cells (hESCs), passive properties, delayed rectifier  $K^+$  channel

\*Corresponding author e-mail: mirnajaf@modares.ac.ir  
Baharvand@RoyanInstitute.org

Available online at: www.phypha.ir/ppj

## وجود جریان های پتاسیمی اصلاح کننده تاخیری در غشا سلول های بنیادی جنینی انسان

سحر کیانی<sup>۱</sup>، سید جواد میر نجفی زاده<sup>۱\*</sup>، ابراهیم شهبازی<sup>۲</sup>، حسین بهاروند<sup>۳\*</sup>

۱. گروه فیزیولوژی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران

۲. پژوهشگاه رویان، پژوهشکده زیست شناسی و فن آوری سلولهای بنیادی، گروه سلولهای بنیادی و زیست شناسی تکوین، تهران

۳. گروه زیست شناسی تکوین، دانشگاه علم و فرهنگ، تهران

پذیرش: ۲۸ تیر ۸۹

دریافت: ۳۱ اردیبهشت ۸۹

### چکیده

**مقدمه:** سلولهای بنیادی جنینی انسان سلولهای پرتوانی هستند که توان تکثیر و تمایز به سایر رده های سلولی را دارا می باشند. بسیاری از ویژگیهای این سلولها، از جمله خصوصیات الکتروفیزیولوژیک آنها هنوز ناشناخته باقی مانده است. در این مطالعه ویژگیهای پاسیو غشا و نیز جریان های پتاسیمی رو به خارج مورد بررسی قرار گرفت.

**روش ها:** رده سلولهای بنیادی جنینی انسان (Royan H6) مورد مطالعه قرار گرفت. به منظور بررسی ویژگیهای الکتروفیزیولوژیک این سلول ها از تکنیک Whole cell patch clamp استفاده شد و جریان های یونی با دپلاریزه کردن سلول از ولتاژ -۹۰ تا +۵۰ میلی ولت ثبت شدند. برای بررسی فارماکولوژیک جریان های یونی ثبت شده داروهای تترائیل آمونیوم کلراید و ۴-آمینوپیریدین برای مهار کانالهای پتاسیمی به کار برده شدند.

**یافته ها:** پتانسیل استراحت در این سلول ها  $0/87 \pm -8/66$  میلی ولت، مقاومت غشا  $0/23 \pm 11/94$  مگا اهم و ظرفیت خازنی  $1/46 \pm 0/55$  نانو فاراد می باشد. با استفاده از روش کلمپ ولتاژی جریانهای یونی رو به خارجی ثبت شدند که با مثبت تر شدن ولتاژ، اندازه آنها افزایش یافت. کانالهای وابسته به ولتاژ پتاسیمی به ویژه  $(I_{KDr})$  delayed rectifier در این سلولها وجود دارند و توسط تترائیل آمونیوم نیز مهار شدند در حالی که در حضور ۴-آمینوپیریدین جریانهای پتاسیمی رو به خارج مهار نشدند. این کانالها فاقد خصوصیت inactivation بوده و جریان رو به خارج از طریق آنها در ولتاژ -۶۰ میلی ولت شروع می شد. میانگین میزان هدایت (conductance) این کانال ها در ولتاژ -۶۰ میلی ولت برابر با  $11/81 \pm 0/45$  پیکوزیمنس و در ولتاژ  $50 =$  میلی ولت  $10/97 \pm 1/40$  پیکوزیمنس بود. هیچگونه جریان رو به داخلی در این سلولها ثبت نگردید.

**نتیجه گیری:** این نتایج پیشنهاد می کند که ویژگیهای الکتروفیزیولوژیک سلولهای بنیادی جنینی کاملا منحصر به فرد می باشد. در این سلولها جریانهای پتاسیمی  $(I_{KDr})$  delayed rectifier که حساس به تترائیل آمونیوم هستند قابل ثبت است در حالی که جریانهای پتاسیمی نوع A که حساس به ۴-آمینوپیریدین می باشند، در این سلولها ثبت نشدند.

**واژه های کلیدی:** سلول های بنیادی جنینی انسان، الکتروفیزیولوژی، خصوصیات پاسیو، کانال پتاسیمی اصلاح کننده تاخیری

### مقدمه

بدست می آیند و توانایی تبدیل شدن به انواع سلولها را دارا هستند. توانایی سلولهای بنیادی جنینی در تکثیر و تمایز، موجب شده تا به عنوان مدلی برای مطالعه مراحل تکوین جنینی و نیز به عنوان کاندیدایی برای سلول درمانی به این سلولها توجه خاص شود. همچنین با آزمایشهای بسیار، توان

سلولهای بنیادی جنینی از مرحله بلاستوسیست جنین

mirmajaf@modares.ac.ir

\* نویسنده مسئول مکاتبات:

Baharvand@RoyanInstitute.org

www.phypha.ir/ppj

وبگاه مجله:

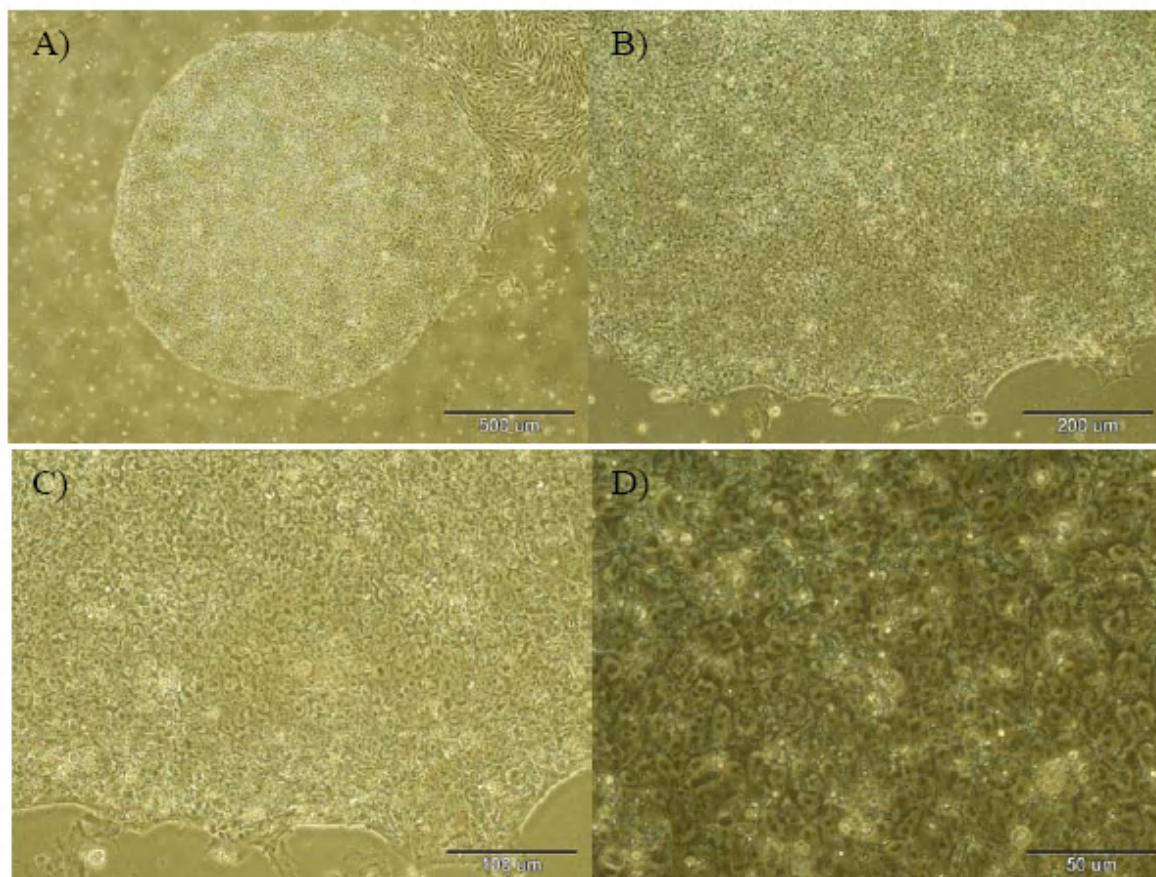
از آغاز مرحله تکامل جنین اووسیت دارای چندین نوع کانالهای یونی است از آن جمله کانالهای سدیم، کلسیم و پتاسیم را می توان نام برد که در چندین گونه جانوری گزارش شدند [۱۴]. همانطور که اشاره شد، سلولهای بنیادی جنینی کاندیدای بسیار خوبی برای درمان سلولی محسوب می شوند، اما خصوصیات الکتروفیزیولوژیک آنها هنوز به خوبی شناخته نشده است. مطالعات نشان می دهند که سلولهای بنیادی جنینی در هر مرحله از تکثیر و تمایز سلولی چندین نوع کانال یونی ویژه را بیان می کنند. استفاده از مهارکننده های کانال های یونی مانند تترائیل آمونیوم، ۴-آمینوپیریدین و آیریوتوکسین تکثیر سلول های بنیادی جنینی انسانی و موشی را به روش وابسته به غلظت کاهش می دهد [۱۳، ۱۵]. بنابراین به نظر میرسد کانالهای یونی در تکثیر و تمایز سلولهای بنیادی جنینی نقش مؤثری دارند و شناخت نوع و عملکرد آنها اطلاعات مهمی را در مورد سلولهای بنیادی به دست خواهد داد. با توجه به اهمیت شناخت ویژگی الکتروفیزیولوژیک سلولهای بنیادی جنینی و پی بردن به نحوه عملکرد آنها، در این مطالعه ویژگیها در سلولهای بنیادی جنینی انسان مورد بررسی قرار گرفت.

## مواد و روشها

رده سلولهای بنیادی جنینی انسان (Royan H6) در این مطالعه مورد استفاده قرار گرفت. این سلولها به صورت Feeder free کشت داده شدند (شکل ۱). ترکیب محیط کشت سلولهای بنیادی جنینی شامل محیط DMEM/F12 (شرکت گیبکو ۲۰۰۲-۲۱۳۳۱) همراه با ۲۰ درصد knock-out serum replacement (شرکت گیبکو ۰۲۸-۱۰۸۲۸)، آل گلوتامین (۲ میلی مولار: ۰۲۴-۲۵۰۳۰ شرکت گیبکو)، بتا مرکاپتواتانول (۰/۱ میلی مولار: ۷۵۲۲-M شرکت سیگما)، اسید آمینه های غیر ضروری یک درصد (شرکت گیبکو ۰۳۵-۱۱۱۴۰)، پنی سیلین (۱۰۰ واحد در هر میلی لیتر)، استرپتومایسین (۱۰۰ mg/ml شرکت گیبکو ۰۶۳-۱۵۰۷۰)، انسولین، ترانسفرین و سلنیت (ITS شرکت گیبکو ۰۴۵-۴۱۴۰۰) و فاکتور رشد فیروبلاستی (bFGF 100 ng/ml شرکت سیگما ۰۲۹۱F). سلولها در انکوباتور حاوی ۵ درصد دی اکسید کربن و ۹۵ درصد رطوبت نگهداری شده و هر هفت روز یکبار پاساژ داده

تمایزی این سلولها نیز مورد بررسی قرار گرفته است، از جمله پتانسیلهای آنها توان تمایز به سلولهای تحریک پذیر می باشد. مطالعات نشان دادند که ویژگیهای الکتروفیزیولوژیک غشا سلولهای تحریک پذیر از جمله سلولهای عصبی و قلبی در طی روند تکوین دچار تغییر می گردد [۳-۷]. در مراحل اولیه تکامل قلب پتانسیل استراحت غشا (RMP) در سلولهای بطنی حدود ۵۰- تا ۴۰- میلی ولت بوده و بتدریج با پیشرفت مراحل تکامل عضله قلب RMP منفی تر شده و در اواخر دوره جنینی به ۷۵- تا ۸۰- میلی ولت خواهد رسید. در مراحل اولیه تکامل این سلولها نفوذپذیری غشاء به کایتونها کمتر است چون کانالهای نشستی کافی برای انتقال یونها وجود ندارد و بنابراین مقاومت غشا در برابر عبور یونها زیاد است به تدریج در طی روند تکامل تغییرات ایجاد شده در تعداد و نوع کانالهای موجود در غشا موجب تغییر نفوذ پذیری و به دنبال آن کاهش مقاومت غشا خواهد شد و قابلیت هدایت یونی (کنداکتانس) افزایش می یابد [۲]. در طی روند تکامل جریان های پتاسیمی حساس به ولتاژ نیز دستخوش تغییر می شوند و تراکم کانالهای پتاسیمی از جمله کانالهای پتاسیمی KDr نیز افزایش خواهد یافت [۲]. مطالعات انجام شده در زمینه تکوین سیستم عصبی نیز حاکی از ایجاد تغییرات در بیان و عملکرد کانالهای یونی وابسته به ولتاژ می باشد [۲، ۹].

در بعضی موجودات مانند موش و دوزیستان چگونگی بیان کانالهای یونی در اووسیت مورد بررسی قرار گرفته است. کانالهای کلسیمی و کانالهای پتاسیمی وابسته به ولتاژ و در بعضی موارد کانالهای کلری در اغلب اووسیت های نابالغ گونه های فوق الذکر گزارش شده اند [۹، ۱۰]. در اووسیت Star Fish نیز در مرحله بلوغ کانالهای پتاسیمی KDr و نیز کانالهای پتاسیمی نوع A مشاهده شده اند مهمترین تغییری که در طی روند بلوغ Star Fish رخ می دهد کاهش کانالهای پتاسیمی KDr می باشد به عبارت دیگر در محدوده ولتاژ غشایی ۷۰- تا صفر میلی ولت جریانات پتاسیمی کاهش می یابند با کاهش جریانات پتاسیمی در واقع مقاومت در برابر عبور یونها افزایش خواهد یافت. در اووسیت قورباغه نیز جریانهای روبه خارج پتاسیمی گزارش شده است [۱۴]. مطالعات انجام شده بر روی اووسیت همستر و موش هیچگونه کانال سدیمی را در این سلولها گزارش نکرده اند. بنابراین قبل



شکل ۱- تصویر میکروسکپ نوری از سلول‌های بنیادی جنینی انسان (A بزرگنمایی ۰.۴، B بزرگنمایی ۱.۰، C بزرگنمایی ۲.۰ و D بزرگنمایی ۴.۰)

شدند. برای پاساژ سلول‌های بنیادی جنینی ابتدا با سالین بافر فسفات (PBS شرکت گیبکو ۰۷۲-۱۷۱۰۵) شستشو داده شده و سپس در محیط حاوی DMEM/F12، کلاژناز نوع چهار ۰.۵ mg/ml شرکت گیبکو ۰۱۹-۱۷۱۰۴، دیسپاز ۱ mg/ml شرکت گیبکو ۰۴۱-۱۷۱۰۵ و یا فقط کلاژناز نوع چهار (۱ mg/ml) به مدت ۵-۷ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد اینکوبه شدند. هنگامی که کلونیه‌ها از کف ظرف جدا شدند، آنزیم از محیط حذف شده و سلول‌ها با سالین بافر فسفات شسته شدند. سپس سلول‌ها به آرامی توسط پیپت جمع آوری شده و به پلیت پوشیده شده با ماتریژل (شرکت سیگما E1۲۷۰) منتقل می‌شدند و در روزهای دیگر فقط محیط کشت سلول‌ها تعویض می‌شد [۴].

در این مطالعه به منظور بررسی ویژگی‌های الکتروفیزیولوژیک سلول‌های بنیادی جنینی انسان از تکنیک Whole cell patch clamp استفاده شد. سلول‌های بنیادی جنینی کشت داده شده بر روی کاور اسلیپ، در روز هفتم به

محفظه ثبت منتقل شدند. ثبت سلولی با استفاده از روش کلمپ ولتاژی و در دمای اتاق ۲۵ درجه سانتیگراد انجام گردید. الکتروود شیشه‌ای با مقاومت ۳-۵ مگا اهم با استفاده از دستگاه میکروپیپت پولر (Sutter P-97) تهیه گردید. سیگنال‌ها توسط آمپلی فایر MultiClamp 700B (شرکت آکسون آمریکا) تقویت شده و توسط دستگاه مبدل Digidata 1440 (شرکت آکسون آمریکا) به کامپیوتر منتقل شدند. داده‌ها با استفاده از نرم افزار pClamp10 ثبت شده و توسط Clampfit 10 آنالیز شدند (نرم افزارها محصول شرکت آکسون آمریکا).

ترکیبات محلول خارج سلولی عبارت بود از (بر حسب میلی مولار): 140 NaCl, 4.5 KCl, 2 CaCl<sub>2</sub>, 1 MgCl<sub>2</sub> و ۱۰ HEPES و 10 D-Glucose و pH محلول با استفاده از NaOH در حدود ۷/۴ تنظیم گردید. همچنین اسمولاریته محلول ۳۰۰ میلی اسمول حفظ شد. محلول داخل پیپت نیز شامل (بر حسب میلی مولار) 140 KCl, 2 CaCl<sub>2</sub>, 1

پتانسیل استراحت غشا  $0.87 \pm 0.66$  - میلی ولت بودند. ثابت زمانی این سلولها در پتانسیل استراحت غشا  $0.12 \pm 0.05$  میلی ثانیه و ظرفیت خازنی غشا سلولی در همین ولتاژ  $0.55 \pm 0.46$  نانوفاراد و مقاوت  $0.23 \pm 0.94$  مگا اهم محاسبه گردید. ثابت زمانی غشا در این سلول ها  $0.3 \pm 0.154$  میلی ثانیه می باشد.

در سلولهای بنیادی جنینی انسان جریانهای رو به خارج در پاسخ به کلمپ ولتاژی ثبت گردید که با افزایش ولتاژ غشا دامنه جریانهای روبه خارج به طور پیش رونده ای افزایش یافت (در ولتاژ  $10$  - میلی ولت اندازه این جریان  $0.11 \pm 0.88$  نانوآمپر بود،  $n=20$ ) (شکل ۲).

به منظور تعیین نوع جریانهای روبه خارج از مهارکننده های کانالهای پتاسیمی مانند تترااتیل آمونیوم و  $4$  - آمینوپیریدین استفاده شد. دامنه جریانهای روبه خارج در حضور غلظت  $10$  میلی مولار تترااتیل آمونیوم به خصوص در ولتاژهای  $40$  - میلی ولت تا  $10$  + میلی ولت بطور معنی داری کمتر بود (در ولتاژ  $10$  - میلی ولت اندازه این جریان  $0.43 \pm 0.75$  نانوآمپر بود،  $n=20$ ،  $P<0.05$ ). تترااتیل آمونیوم مهارکننده عمومی کانالهای پتاسیمی به ویژه delayed rectifier می باشد. بنابراین به نظر می رسد بخشی از جریانهای روبه خارج در این سلولها مربوط به کانالهای پتاسیمی delayed rectifier (IKDR) باشد. این کانالها فاقد خصوصیت inactivation بوده و در تمام مدت تحریک ( $500$  میلی ثانیه) جریان رو به خارج را نشان می دادند. این جریان رو به خارج از ولتاژ  $60$  - میلی ولت شروع می شود. میانگین میزان هدایت (conductance) این کانال ها در ولتاژ  $60$  - میلی ولت برابر با  $0.45 \pm 0.81$  پیکوزیمنس و در ولتاژ  $50$  = میلی ولت  $0.97 \pm 0.40$  پیکوزیمنس بود. جریانهای رو به خارج در سلولهای بنیادی جنینی در حضور  $4$  - آمینوپیریدین نیز ثبت شدند، این دارو مهارکننده اختصاصی تری در مقایسه با تترااتیل آمونیوم است که بویژه کانالهای پتاسیمی نوع A را مهار می کند. غلظت  $5$  میلی مولار این ماده نتوانست دامنه جریانهای رو به خارج را بطور معنی داری کاهش دهد (در ولتاژ  $10$  - میلی ولت اندازه این جریان  $0.18 \pm 0.91$  نانوآمپر بود،  $n=20$ ). با توجه به اثر کشنده این دارو در غلظت های بالاتر در این مطالعه فقط از غلظت  $5$  میلی مولار استفاده شد که هیچ گونه اثر سمیت بر سلولهای مورد مطالعه

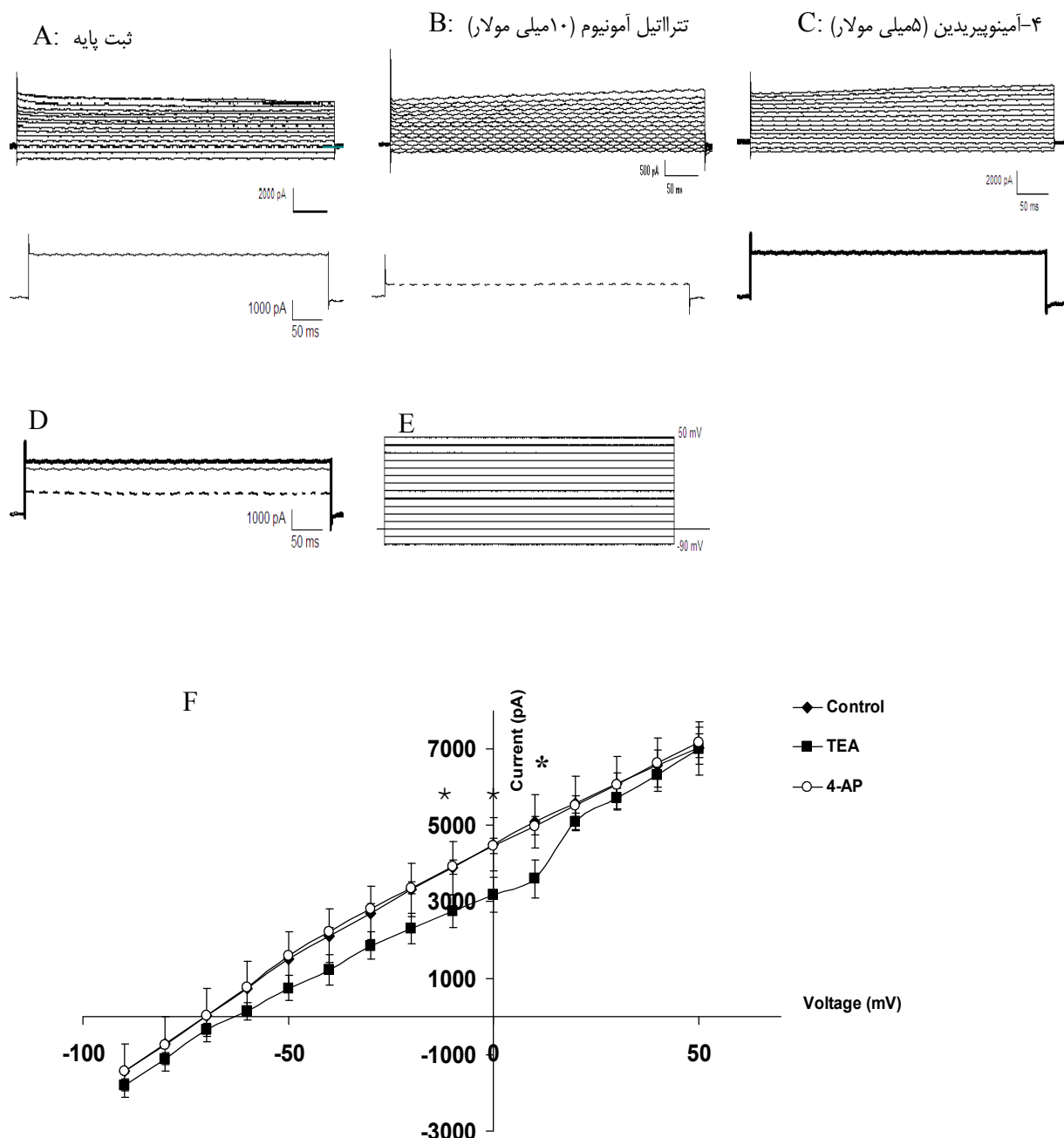
EGTA و  $10$ HEPES  $11$  pH محلول با استفاده از KOH حدود  $7/2$  و اسمولاریته نیز حدود  $300$  میلی اسمول بود (با استفاده از اسمومتر شرکت WAPOR). در این مطالعه برای مهار کانال های پتاسیمی نیز از داروهای تترااتیل آمونیوم کلراید ( $10$  میلی مولار، شرکت سیگما) و  $4$  - آمینوپیریدین ( $5$  میلی مولار، شرکت سیگما) استفاده شد. داروها در محلول خارج سلولی حل شده و توسط سیستم پرفیوژن (شرکت ALA) به پلیت حاوی سلول منتقل شدند. در هر مرحله از آزمایش ابتدا خصوصیات پاسیو غشا از جمله پتانسیل استراحت، مقاومت و ظرفیت خازنی (کاپاسیتانس) غشا با استفاده از نرم افزار pClamp10 اندازه گیری شد.

برای تعیین مقاومت ابتدا با استفاده از کلمپ جریانی، جریانهای هیپرپلاریزان از  $5/0$  - نانو آمپر تا  $1/0$  - نانو آمپر به سلول تزریق شده و تغییر ولتاژ غشا به دنبال تزریق جریان ثبت می گردید، سپس نمودار جریان - ولتاژ رسم شده و شیب خط حاصل، بیانگر میزان مقاومت سلول می باشد.

برای ثبت جریان های یونی وابسته به ولتاژ در سلول های بنیادی جنینی، با استفاده از کلمپ ولتاژی، ولتاژ غشا از  $90$  - میلی ولت تا  $50$  + میلی ولت به مدت  $500$  میلی ثانیه و با فواصل ولتاژی  $10$  میلی ولت کلمپ شده و پاسخ سلول در هر کلمپ ولتاژی ثبت می شد. لازم به ذکر است که برای انجام کلمپ ولتاژی ابتدا ولتاژ غشا در  $70$  - میلی ولت نگهداشته می شد. ظرفیت خازنی یکی دیگر از خصوصیات پاسیو غشا می باشد که در این مطالعه مورد ارزیابی قرار گرفت. برای محاسبه ظرفیت خازنی با استفاده از نرم افزار Clampfit 10، ابتدا خط پایه (Adjust Baseline) برای ثبت های هر سلول تعیین می شود و سپس با حذف بخش نشت جریان از هر یک از ثبت ها (Leak Subtraction)، ثبت مورد نظر Fit می شود و مقادیر ظرفیت خازنی غشا به این روش توسط نرم افزار تعیین می گردد. داده ها بصورت  $Mean \pm SEM$  نشان داده شدند. مقایسه آماری قبل و بعد از تزریق داروها از آزمون one way ANOVA و آزمون متعاقب Tukey test انجام گردید.

## یافته ها

سلولهای بنیادی جنینی انسان در مرحله تمایز نیافته دارای



**شکل ۲-** ثبت از سلولهای بنیادی جنینی انسان به روش کلمپ ولتاژی: ثبت کامل از یک سلول و ثبت همان سلول در ولتاژ  $-20$  میلی ولت در حالت های (A) ثبت پایه بدون حضور داروها (B) ثبت در حضور  $5$  میلی مولار  $4$ -آمینوپیریدین (C) ثبت در حضور  $10$  میلی مولار تترائیل آمونیوم (D) ثبت در ولتاژ  $-20$  میلی ولت هر سه حالت را نشان می دهد. (E) پروتوکل کلمپ ولتاژی مورد استفاده در ثبت های A، B و C. (F) نمودار رابطه جریان - ولتاژ در هر سه گروه مورد مطالعه (one way ANOVA,  $*p < 0.05$ ).

جنینی انسان دارای ویژگیهای منحصر به فردی می باشند. پتانسیل استراحت غشای این سلولها بسیار مثبت تر از سلولهای بالغ بوده و همچنین مقاومت و ظرفیت خازنی آنها نسبت به سلولهای بالغ کمتر است. علت مثبت بودن پتانسیل استراحت غشا به درستی مشخص نمی باشد. با توجه به اینکه مهمترین عامل تعیین کننده پتانسیل استراحت، نفوذپذیری غشا به یون های مختلف است، بنابراین احتمالاً کانال های یونی در این سلول ها با سلول های بالغ متفاوت می باشد.

نداشته باشد. بنابراین تنها در حضور تترائیل آمونیوم دامنه جریانهای رو به خارج پتاسیمی کاهش معنی داری را نشان داد. هیچ گونه جریان رو به داخل سدیمی، کلسیمی و پتاسیمی از این سلولها ثبت نگردید

## بحث

نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که سلولهای بنیادی

وجود ندارند و یا در این مرحله از نظر روند تکاملی پروتئین کانال قادر به پاسخ دهی به داروی مهارکننده نیستند و بخش اصلی جریانهای روبه خارج پتاسیمی در hESC جریانهای IKDR می باشند. احتمالاً به همین دلیل است که مهار کننده های IKDR بر تکثیر سلولهای جنین انسانی اثر قویتری دارند. ثبت جریانهای پتاسیمی در hESC پیشنهاد می کند که کانالهای پتاسیمی در حقیقت با اثر بر پتانسیل استراحت غشا بر تکثیر و چرخه سلولی موثر بوده و به عنوان حلقه رابطه بین فرآیندهای بیوشیمیایی و فیزیولوژی عمل می نماید. برای آنکه چرخه سلولی پیشرفت نموده و وارد مرحله G1 گردد لازمست کانالهای پتاسیمی KDR وارد عمل شده و با خروج پتاسیم و هیپرپلاریزه نمودن پتانسیل غشاء شرایط لازم برای این پیشرفت را فراهم نمایند. به همین دلیل مهار فارماکولوژیک این کانالها منجر به مهار و توقف تکثیر سلولهای بنیادی جنینی انسانی می گردد [۱۵].

در مطالعه ای که توسط Wang و همکارانش در سال ۲۰۰۵ انجام شد [۱۵]. سلولهای بنیادی جنینی موشی و سلولهای بنیادی جنینی انسانی از نظر خصوصیات الکتروفیزیولوژیک و بیان کانالهای یونی در طی روند تمایز خودبخودی با یکدیگر مقایسه شدند. در این مطالعه گزارش شد که جریانهای پتاسیمی رو به خارج (IKDR) در سلولهای بنیادی جنینی موش (mESC) وجود دارد که به صورت وابسته به غلظت توسط تترااتیل آمونیوم (TEA) و ۴-آمینوپیریدین (4-AP) مهار می گردد و نیز مشاهده شد که جریانهای سدیمی و کلسیمی وابسته به ولتاژ در mESC وجود ندارد همچنین جریان پتاسیمی رو به داخل که برای حفظ پتانسیل استراحت غشاء ضروریست در mESC گزارش نشد. در سلولهای بنیادی جنین انسان کانالهای پتاسیمی KDR که در mESC مشاهده شده بود نیز گزارش شد. البته میزان جریانهای پتاسیمی IKDR در سلولهای انسانی شش برابر بیشتر از mESC بود و در hESC نیز مانند mESC، TEA به صورت وابسته به غلظت می تواند تکثیر سلولی را مهار کند. در mESC جریان کاتیونی روبه داخل که در ولتاژهای منفی فعال می گردد (I<sub>h</sub>) ثبت گردید، در حالیکه چنین جریانی در hESC گزارش نشد [۱۵].

Kawano و همکارانش در سال ۲۰۰۴ گزارش کردند که در

در این تحقیق، کانال های نشستی پتاسیمی و نیز پمپ سدیم - پتاسیم که در ایجاد پتانسیل استراحت غشا و در حفظ آن نقش دارند، بررسی نشدند، لذا از آنجایی که پتانسیل استراحت غشا در سلول های بنیادی جنینی به صفر نزدیک تر بوده و نگاتیویته کمی دارد، احتمال می رود که این کانال ها در سلول های بنیادی جنینی فاقد عملکرد فیزیولوژیک باشند و نمی توانند پتانسیل استراحت غشا سلول ها را در محدوده پتانسیل نرنست برای یون های پتاسیمی تنظیم کنند. احتمال دیگری که بر اساس مطالعات انجام شده در زمینه تکوین سیستم عصبی می توانند مطرح باشد این است که آن چه که پتانسیل استراحت غشا را در سلول های بنیادی جنینی تعیین می کند، گرادیان غلظتی و نفوذپذیری به یون های دیگر از جمله یون کلراید باشد که در مراحل ابتدایی تکوین جنینی نقش بسیار مهمی دارد و در این مطالعه بررسی نشد [۱،۳۶].

در این تحقیق از دیگر خصوصیات غیرفعال غشا، مقاومت، ظرفیت خازنی و ثابت زمانی نیز مورد بررسی قرار گرفت. سلول های بنیادی جنینی انسان سلول هایی هستند با قطر حدود ۱۲ میکرومتر، بنابراین به نظر می رسد اندازه سلول های بنیادی جنینی انسان دلیلی بر بیشتر بودن ظرفیت خازنی غشا در سلولهای بنیادی جنینی انسان است. مقاومت غشا در سلولهای بنیادی جنینی با وجود اندازه سلول ها پایین است که به نظر می رسد، ناشی از کمتر بودن کانال های یونی وابسته به ولتاژ در این سلول ها باشد.

با مثبت شدن ولتاژ غشا جریانهای رو به خارجی در این سلولها مشاهده شده که حساس به تترااتیل آمونیوم می باشد و بنابراین به نظر می رسد که کانالهای پتاسیمی KDR باشند. همانگونه که نتایج نشان داد، این کانالها فاقد خصوصیت inactivation بوده و از ولتاژ ۶۰- میلی ولت شروع می شود.

دامنه جریانهای روبه خارج پتاسیمی در حضور تترااتیل آمونیوم از  $3/88 \pm 0/113$  نانوآمپر به  $2/75 \pm 0/43$  نانوآمپر کاهش یافته است در حالی که در حضور ۴-آمینوپیریدین کاهش معنی داری در دامنه جریان مشاهده نگردید. بنابراین بخشی از جریانهای پتاسیمی رو به خارج حساس به تترااتیل آمونیوم بودند در حالی که هیچ گونه حساسیتی به ۴-آمینوپیریدین، مهار کننده جریانهای پتاسیمی نوع A ندارند. بنابراین به نظر میرسد کانالهای پتاسیمی نوع A در hESC

هشتم استفاده نمودند جریانهای کلسیمی نوع T را گزارش نموده اند [۱۶، ۱۷]. در این مطالعه هیچ گونه جریان روبه داخل از hESC ثبت نگردید. بنابراین به نظر می رسد کانالهای وابسته به ولتاژ سدیمی و کلسیمی از آن جمله کانالهای نوع T و L در این سلولها فاقد عملکرد هستند در این مرحله به نظر می رسد نقش کانالهای پتاسیمی  $K_{DR}$  بسیار حائز اهمیت است. کانالهای پتاسیمی  $K_{DR}$  با خروج پتاسیم و هیپرپلاریزه نمودن پتانسیل غشا شرایط لازم برای پیشرفت چرخه سلولی به مرحله G1 فراهم می کنند.

### سپاسگزاری

تحقیق حاضر تحت حمایت های مالی پژوهشگاه رویان و معاونت پژوهشی دانشگاه تربیت مدرس انجام شده است.

mESC تامین کننده اصلی کلسیم ذخایر درون سلولی هستند و در این مطالعه با استفاده از تکنیک های الکتروفیزیولوژی و RT-PCR نتوانستند وجود کانالهای کلسیمی وابسته به ولتاژ را در این سلولها ثابت کنند [۱۶]. به نظر می رسد شرایط آزمایش و نوع پاساژ سلولی مورد استفاده موجب شده تا یافته های متفاوتی گزارش گردد. بنابراین در مراحل اولیه کشت mESC می توان گفت که کانالهای کلسیمی وابسته به ولتاژ وجود ندارد که اغلب مطالعات الکتروفیزیولوژیک این موضوع را تایید می کند. بتدریج در طی روند تمایز سلولی بیان این نوع کانالها آغاز شده و بر اساس شرایط محیط سلول و فاکتورهای رشد مورد استفاده میزان و نوع کانالهای موجود متغیر خواهد بود. مطالعاتی که از سلولهای بنیادی جنینی موش در پاساژ اول و دوم سلولی استفاده نمودند هیچ گونه جریان یونی کلسیمی را گزارش نکردند در حالی که مطالعاتی که از پاساژ سلولی چهارم تا

## References

- [1] Blackiston DJ, McLaughlin KA, and Levin M. Bioelectric controls of cell proliferation: ion channels, membrane voltage and the cell cycle. *Cell Cycle* 8 (2009) 3519-3528.
- [2] Hagiwara S, Jaffe LA, Electrical properties of egg cell membranes. *Annu Rev Biophys Bioeng* 8 (1979) 385-416.
- [3] Hartzell HC, Yu K, Xiao Q, Chien LT, and Qu Z. Anoctamin/TMEM16 family members are  $Ca^{2+}$ -activated  $Cl^-$  channels. *J Physiol* 587 (2009) 2127-2139.
- [4] Hatami M, Zare Mehrjardi N, Kiani S, Hemmesi K, Azizi H, Shahverdi AH, Baharvand H. Human embryonic stem cell-derived neural precursor transplants in collagen scaffolds promote recovery in injured rat spinal cord *J Cytotherapy* 11 (2009) 618-30.
- [5] Kawano S, Otsu K, Shoji S, Yamagata K, Hiraoka M.  $Ca^{2+}$  oscillations regulated by  $Na^{2+}$ -  $Ca^{2+}$  exchanger and plasma membrane  $Ca^{2+}$  pump induce fluctuations of membrane currents and potentials in human mesenchymal stem cells *Cell Calcium* 34 (2003) 145-156.
- [6] Li Y, O'Neill C, and Day ML. Activation of a chloride channel by a trophic ligand are required for development of the mouse preimplantation embryo in vitro. *Biol Reprod* 81 (2009) 759-767.
- [7] Lu L, Motrose-Rafizadeh C, Hwang TC, Guggino WB. A delayed rectifier potassium current in *Xenopus* oocytes. *Biophys J* 57 (1990) 1117-1123.
- [8] Miledi R, Woodward RM. Effects of defolliculation on membrane current responses of *Xenopus* oocytes *J Physiol* 416 (1989) 601-621.
- [9] Moody WJ, Simomcini L, Coombs L, Spruce AE, Villaz M. Development of ion channels in early embryos *J Neurobiol* 22 (1991) 674-684.
- [10] Okamoto H, Takahashi K, Yamashita N. Ionic currents through the membrane of the mammalian oocyte and their comparison with those in the tunicate and sea urchin *J Physiol* 266 (1977) 465-495.
- [11] Okamoto H, Takahashi K, Yoshii M. two components of the calcium current in the egg cell membrane of the tunicate *J Physiol* 266 (1976) 527-561.
- [12] Parker I, Ivorra I. A slowly inactivating potassium current in native oocytes of *Xenopus laevis* *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 238 (1990) 369-381.
- [13] Piper DR, Mujtaba T, Rau MS, Lucero MT. Immunocytochemical and physiological characterization of a population of cultured human neural precursors *J Neurophysiol* 84 (2000) 534-548.



- [14] Thibault C, Szöllösi D, Gérard M. Mammalian oocyte maturation *Reprod Nutr Dev* 27(1987) 865-96.
- [15] Wang K, Xue T, Tsang SY, Van Hulzen R, Wong CW, Lal KW, Ye Z, Cheng L, Au KW, Zhang J, Li GR, Lau CP, Tse HF, Li RA. Electrophysiological properties of pluripotent human and mouse embryonic stem cells. *Stem Cells* 23 (2005)1526-1534.
- [16] Yanagida E, Shoji S, Hirayama Y, Yoshikawa F, Otsu K, Uematsu H, Hiraoka M, Furuichi T, Kawano S. Functional expression of Ca<sup>2+</sup> signaling pathways in mouse embryonic stem cells. *Cell Calcium* 36 (2004) 135-146.
- [17] Zhang YM, Shang L, Hartzell C, Narlow M, Cribbs L, Dubley SC. Characterization and regulation of T-type Ca<sup>2+</sup> channels in embryonic stem cell-derived cardiomyocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 285 (2003) 770-779.