

## Transduction of Mesenchymal Stem Cells that Express VEGF-A and Pre-conditioning with SDF1 $\alpha$ In order to Increase Survival for use in Myocardial Infarction Treatment in a Rat Model

Rezvan Esmaeili<sup>1</sup>, Keivan Majidzadeh-A<sup>2, 3\*</sup>, Leila Eini<sup>4</sup>, Parisa Hoseinpour<sup>5</sup>, Azin Teymourzadeh<sup>6</sup>, Majid Sadeghizadeh<sup>7\*\*</sup>

- 1- Ph.D. Candidate, Department of Genetics, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
- 2- Associate Professor, Department of Cancer Genetics, Breast Cancer Research Center, ACECR, Tehran, Iran
- 3- Associate Professor, Tasnim Biotechnology Research Center (TBRC), Faculty of Medicine, AJA University of Medical Sciences, Tehran, Iran
- 4- Ph.D. Candidate, Department of Cancer Genetics, Breast Cancer Research Center, ACECR, Tehran, Iran
- 5- Assistant Professor, Breast Cancer Research Center, ACECR, Tehran, Iran
- 6- MD Student, Department of Cancer Genetics, Breast Cancer Research Center, ACECR, Tehran, Iran
- 7- Professor, Department of Molecular Genetics, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

\*Corresponding Address: P.O.Box: 13145-855, Department of Cancer Genetics, Breast Cancer Research Center, ACECR, Tehran, Iran  
Email: kmajidzadeh@razi.tums.ac.ir

\*\*Corresponding Address: Postal Code: 1411713116, Department of Molecular Genetics, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran  
Email: sadeghma@modares.ac.ir

Received: 23/Sep/2015, Accepted: 09/Nov/2015

### Abstract

**Objective:** The use of stem cells, particularly mesenchymal stem cells (MSCs), with genes and various growth factors as treatments for myocardial infarction and various other diseases is highly regarded. However these cells meet with inflammation and a hypoxic environment in the target tissue. Hence, treatment with factors that increase the resistance of these stem cells is of importance. Stem cells also can be used as carriers for gene therapy. The aim of the present research is to produce VEGF expressing MSCs. We investigate the effect of stromal derived factor 1 on MSC survival in order to use these cells in a future rat myocardial infarction model.

**Methods:** MSCs were purified from young male rats by aspirating the cavity of femurs and tibias. After characterization, MSCs were transduced with VEGF using lipofectamine. Expression and function of VEGF was confirmed. Next, we treated MSCs with SDF1 $\alpha$  at various time points. The effect of this chemokine was investigated using the LDH assay and by viable cell counts.

**Results:** The experiments confirmed the production and function of VEGF by MSCs. The LDH levels decreased significantly in SDF1 $\alpha$  treated MSCs. Cell viability increased significantly in the presence of this chemokine.

**Conclusion:** Treatment of MSCs with the SDF1 $\alpha$  chemokine has increased the survival of these cells. These MSCs are proper candidates for increasing angiogenesis and for further analysis in a rat model of myocardial infarction.

**Keywords:** Mesenchymal stem cells, VEGF, SDF1 $\alpha$ , Myocardial infarction

Modares Journal of Medical Sciences: *Pathobiology*, Vol. 18 (2015-2016), No.3, Pages: 45-58

# ایجاد سلول‌های بنیادی مزانشیمی بیان کننده ژن VEGF-A و پیش تیمار با SDF1 $\alpha$ به منظور افزایش بقا در استفاده در درمان سکته قلبی

رضوان اسمعیلی<sup>۱</sup>، کیوان مجید زاده اردبیلی<sup>۲\*</sup>، لیلا عینی<sup>۳</sup>، پریسا حسین پور<sup>۴</sup>، آذین تیمورزاده<sup>۵</sup>، مجید صادقی زاده<sup>۶\*</sup>

- ۱- دانشجوی دکتری تخصصی، گروه ژنتیک مولکولی، دانشکده علوم زیستی، دانشکده تربیت مدرس، تهران، ایران
- ۲- دانشیار، گروه پژوهشی ژنتیک سرطان، مرکز تحقیقات سرطان پستان، جهاد دانشگاهی، تهران، ایران
- ۳- دانشیار، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی تسنیم، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی آجا، تهران، ایران
- ۴- دانشجوی دکتری تخصصی، گروه پژوهشی ژنتیک سرطان، مرکز تحقیقات سرطان پستان، جهاد دانشگاهی، تهران، ایران
- ۵- استادیار، مرکز تحقیقات سرطان پستان، جهاد دانشگاهی، تهران، ایران
- ۶- دانشجوی پزشکی، گروه پژوهشی ژنتیک سرطان، مرکز تحقیقات سرطان پستان، جهاد دانشگاهی، تهران، ایران
- ۷- استاد، گروه ژنتیک مولکولی، دانشکده علوم زیستی، دانشکده تربیت مدرس، تهران، ایران

\*آدرس نویسنده مسؤل: ایران، تهران، صندوق پستی ۸۵۵-۱۳۱۴۵، جهاد دانشگاهی، مرکز تحقیقات سرطان پستان، گروه پژوهشی ژنتیک سرطان  
Email: kmajidzadeh@razi.tums.ac.ir

\*\*آدرس نویسنده مسؤل: ایران، تهران، کدپستی: ۱۴۱۱۷۱۳۱۱۶، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم زیستی، گروه ژنتیک مولکولی  
Email: sadeghma@modares.ac.ir

پذیرش مقاله: ۹۴/۰۸/۱۸

دریافت مقاله: ۹۴/۰۷/۰۱

## چکیده

**هدف:** امروزه به استفاده از سلول‌های بنیادی مزانشیمی در درمان بیماری‌های مختلف، از جمله سکته قلبی بسیار توجه شده است. اما چالش بزرگ در این زمینه از بین رفتن این سلول‌ها پس از تزریق و در مواجهه با شرایط کمبود اکسیژن و التهابی است. از این رو یافتن عواملی که پیش تیمار با آن بتواند مسیرهای بقا را در این سلول‌ها افزایش دهد بسیار اهمیت دارد. در این مطالعه ابتدا سلول‌های بنیادی مزانشیمی بیان کننده ژن VEGF به عنوان عامل رگ‌زایی ایجاد شد و پس از آن تأثیر پیش تیمار با SDF1 $\alpha$  در بقای این سلول‌ها بررسی شد. نتایج موفقیت‌آمیز در این زمینه، این سلول‌ها را به کاندید مناسبی برای مطالعات بیشتر و استفاده در مدل رتی سکته قلبی به منظور بهبود عملکرد قلب تبدیل می‌کند.

**مواد و روش‌ها:** سلول‌های بنیادی مزانشیمی از مغز استخوان رت استخراج شد و پس از تأیید هویت، ژن VEGF-A165 با استفاده از ناقل لنتی ویروسی به آن انتقال یافت. پس از تأیید بیان و عملکرد این ژن، سلول‌ها در دو زمان با SDF1 $\alpha$  تیمار شدند. پس از آن بررسی‌های لازم برای تأثیر این کموکاین بر سلول‌ها از طریق اندازه‌گیری میزان آنزیم لاکتات دهیدروژناز و میزان بقای سلول‌ها انجام شد.

**نتایج:** سلول‌های جدا شده از نظر بنیادی بودن، بیان VEGF و عملکرد تأیید شد. میزان لاکتات دهیدروژناز در سلول‌های تیمار شده با این کموکاین، کمتر از سلول‌های تیمار نشده بود. در صد سلول‌های زنده در مجاورت این کموکاین بیشتر از کنترل بود.

**نتیجه‌گیری:** تیمار با SDF1 $\alpha$  منجر به افزایش بقا در سلول‌های بنیادی است. احتمال می‌رود که این سلول‌ها بتوانند در سکته قلبی، از طرفی باعث افزایش رگ‌زایی شوند و از طرف دیگر بقای بیشتری در بافت سکته شده داشته باشند که مطالعات حیوانی برای اثبات آن نیاز است.

**کلیدواژگان:** سلول‌های بنیادی مزانشیمی، VEGF، SDF1 $\alpha$ ، سکته قلبی

مجله علوم پزشکی مدرس: آسیب شناسی زیستی، دوره ۱۸، شماره ۳، پاییز ۱۳۹۴، صفحات: ۴۵-۵۸

## مقدمه

جذب ناکافی ناقل یا ترانسفکشن (Transfection) ناکافی میوکارد (Myocardium) باشد. از طرفی القای نامناسب رگ‌زایی ممکن است منجر به بدخیمی شود [۱۳-۱۶]. تحقیقات بیشتری در مورد حامل مورد استفاده و تعیین پارامترهای مجهول مورد نیاز است. همچنین پیامدهای متفاوت از مطالعات مختلف نشان می‌دهد که مطالعات بیشتری برای بهینه‌سازی عوامل مؤثر در انتقال از جمله، میزان سلول و روش انتقال به صورت پروتئین، ژن یا سلول و همچنین یافتن ترکیب مناسبی از عوامل ژنی و تیمارهای خاص نیاز است [۱۷]. در این مطالعه پس از جداسازی و تأیید سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان، ژن VEGF توسط ناقل لتی ویروسی به آن منتقل شد و پس از آن تأثیر پیش تیمار MSC ها با SDF1α در بقای این سلول‌ها بررسی شد. یافته موفقیت‌آمیز از این تحقیق می‌تواند ترکیب ژن VEGF به همراه پیش تیمار با این کموکاین را به عنوان کاندیدی برای مطالعات حیوانی در درمان سکته قلبی تبدیل کند.

## مواد و روش‌ها

### جداسازی سلول‌های بنیادی مزانشیمی از رت

تمامی مراحل کار براساس استانداردهای اخلاقی تحقیقات حیوانی تأیید شده توسط وزارت بهداشت و درمان و آموزش پزشکی انجام شد. قبل از انجام مطالعه، پروپوزال در کمیته اخلاق پژوهشگاه تصویب شد.

برای جداسازی سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان از دو رت ۸ هفته‌ای استفاده شد. استخراج سلول با استفاده از آسپیریشن مغز استخوان از استخوان فمور (Femur) و تیبیا (Tibia) پس از بیهوش کردن حیوان انجام شد. سلول‌های خارج شده به همراه محیط کشت جدید و سرم ۲۰ درصد داخل چهار فلاسک ۷۵ سانتی‌متری منتقل شد. فلاسک‌ها در زیر میکروسکوپ معکوس مشاهده شدند تا از خارج شدن سلول‌ها از استخوان و وجود آن‌ها در فلاسک مطمئن شویم.

امروزه به استفاده از سلول‌های بنیادی به همراه ژن‌ها و عوامل رشد مختلف در درمان بیماری‌های مختلف بسیار توجه شده است [۱]. درمان بیماری‌های قلبی به خصوص سکته قلبی نیز از این گزینه مستثنی نیست. سلول‌های بنیادی مزانشیمی (Mesenchymal Stem Cells: MSCs) یکی از بهترین سلول‌های بنیادی در درمان سکته قلبی است. اما مشکلی که در درمان با این سلول‌ها وجود دارد این است که سلول‌های پیوند شده شرایط کم خونی را تجربه می‌کنند که باعث کم شدن مواد مغذی و اکسیژن و افزایش التهاب است [۲]. از آنجایی که سکته قلبی با انسداد یک یا تعداد بیشتری از عروق خون رسان به قلب ایجاد می‌شود، این آسیب به سلول‌های MSC زیاد شده و باعث فعال شدن پیام‌های مرگ می‌شود؛ در نتیجه تیمار با موادی که بتواند مقاومت سلول‌ها را افزایش دهد در جلوگیری از این مرگ و میر نقش مؤثری خواهد داشت [۳، ۴]. استفاده دیگری که از سلول‌های بنیادی می‌شود، انتقال ژن‌های خاص توسط آن‌ها به محل بافت آسیب دیده است. بدین طریق این سلول‌ها می‌توانند نقش کارخانه سازنده این پروتئین‌ها را داشته باشند [۵].

مطالعاتی روی استفاده از ژن VEGF-A (Vascular Endothelial Growth Factor A) به عنوان عامل رشد عروق و همچنین استفاده از کموکاین SDF1α (Stroma Cell-Derived Factor 1 alpha) به عنوان فراخوان سلول‌های بنیادی انجام شده است که نتایج ضد و نقیضی به همراه داشته است [۶-۸]. برخی مطالعات گزارش کرده‌است که این عوامل به‌ویژه SDF1α از طریق افزایش لانه‌گزینی، بقا و تکثیر سلول‌های بنیادی، باعث بازسازی کاردیومیوسیت‌ها (Cardiomyocytes)، رگ‌زایی (Angiogenesis) و بازسازی بطن می‌شود [۹-۱۲]. از طرف دیگر، برخی مطالعات تأثیر منفی این عامل روی عملکرد قلب را گزارش کرده‌است. این تفاوت در نتایج ممکن است به علت تعداد کم سلول و از بین رفتن آن در محیط بدون اکسیژن درون بافت دچار سکته،

فلاسک‌ها داخل انکوباتور کشت سلول با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و هوای مرطوب حاوی CO<sub>2</sub> ۵ درصد قرار گرفتند و هر روز برای بررسی سلول‌ها و تأیید عدم آلودگی بررسی شدند. پس از طی زمان مناسب سلول‌ها پاساژ داده شد و در تانک ازت برای مراحل بعدی ذخیره شد.

### تعیین هویت سلول‌های بنیادی مزانشیمی

تعیین هویت سلول‌های بنیادی مزانشیمی با استفاده از تمایز استخوانی و چربی و همچنین اندازه‌گیری نشانگرهای سطحی در آن‌ها با فلوسایتومتری انجام شد.

### تمایز استخوانی

به‌منظور تمایز استخوانی، سلول‌ها در مرحله پاساژ سوم با تعداد ۷۰ هزار در چاهک‌های پلیت ۶ خانه در حضور محیط کشت DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) حاوی ۱۰ درصد DMEM کشت شدند. سپس به سلول‌ها اجازه داده شد تا کف ظرف را پر نمایند. پس از اطمینان از پر شدن کف ظرف توسط سلول‌ها، محیط کشت تمایزی حاوی ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر آسکوربیک اسید ۲-فسفات، ۱۰ نانومولار دکزامتازون و ۱۰ میلی‌مولار بتا-گلیسرول فسفات جایگزین شد.

دو خانه از سلول‌ها نیز با محیط معمولی به‌عنوان کنترل استفاده شد. کشت تمایزی به‌مدت ۲۱ روز انجام و هر سه روز یک بار محیط کشت تعویض شد و در پایان این مدت وقوع تمایز با رنگ‌آمیزی آلزارین قرمز (Alizarin red) ارزیابی شد.

### تمایز به بافت چربی

برای این منظور از سلول‌های پاساژ سوم استفاده شد. ابتدا سلول‌ها به چاهک‌های پلیت شش خانه‌ای کشت انتقال داده شدند و زمانی که کف ظرف کشت حدود ۸۰ درصد پوشیده شد، برای تمایز استفاده شد. محیط معمولی سلول‌ها با محیط

تمایزی چربی هر ۳ روز یک‌بار تعویض شد. محیط تمایزی چربی همانند محیط تمایز به استخوان است؛ با این تفاوت که دکزامتازون آن ۷-۱۰ مولار و به جای بتا گلیسرول فسفات از ایندومتاسین (Indomethacin) با غلظت نهایی ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر استفاده شده است. دو خانه از سلول‌ها نیز با محیط معمولی به‌عنوان کنترل استفاده شد. سلول‌ها به‌مدت ۲۱ روز در شرایط رشد نگهداری و در پایان این مدت تمایز با روش رنگ‌آمیزی Oil RedO ارزیابی شد.

### بررسی نشانگرهای سطحی با فلوسایتومتری

سلول‌های پاساژ سوم بعد از تریپسینه و سانتریفیوژ کردن در اپندورف (Eppendorf) ریخته و با PBS (Phosphate Buffered Saline) شسته شدند. سپس به‌مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند. آنتی‌بادی‌های اولیه CD90، CD45، CD44 و CD29 کوئزوگه با PE (Phcoerythrin) و FITC (Fluorescin Isothiocyanate) به همراه ایزوتاپ آنتی‌بادی‌های مربوط به آن‌ها کوئزوگه با PE و FITC اضافه شد (Abcam، آمریکا) و به‌مدت ۳۰ دقیقه در یخچال قرار گرفت. در مرحله بعد سلول‌ها پس از شستشو با PBS به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند. سپس با دستگاه فلوسیتومتری تجزیه و تحلیل شدند.

### جداسازی و همسانه‌سازی ژن VEGF

استخراج RNA از بافت قلبی با استفاده از RNXPlus (سیناژن، ایران) و طبق دستورالعمل سازنده انجام شد. پس از تأیید کیفیت و کمیت RNA با استفاده از ژل آگارز و اسپکتروفوتومتری سنتز cDNA (Qiagen، آمریکا) انجام شد و پس از آن با استفاده از آغازگرهای (Primers) این ژن که سایت برش SmaI برای آغازگر رفت و BamHI برای آغازگر برگشت در آن قرار داده شده بود، واکنش زنجیره پلیمراز انجام شد. توالی آغازگرها بدین صورت بود. F: CCCCCGGA و R: TCACCG و TGAACCTTCTGCTGCTTGGGTG

## ایجاد سلول‌های بنیادی مزانشیمی بیان کننده ژن VEGF-A

بعد سلول‌های بنیادی مزانشیمی را در فلاسک ۲۵ سانتی‌متری کشت داده شدند تا به سطح پوشش ۳۰ درصد برسند. سپس محیط رویی سلول‌ها با محیط حاوی ویروس از مرحله قبل تعویض شد. معادل هر میلی‌لیتر از محیط حاوی ویروس ۴ میکرولیتر از پلی‌برن (Polybrene) با غلظت ۲ میکروگرم در میلی‌لیتر اضافه شد. پس از چهار تا پنج روز سلول‌ها زیر میکروسکوپ فلورسانس بررسی شدند.

## بررسی بیان VEGF

به منظور اطمینان از بیان ژن VEGF در سلول‌های بنیادی، بیان این ژن با روش Real-Time PCR اندازه‌گیری شد. از ژن ACTB (NC\_005107.4) به عنوان کنترل استفاده شد. همچنین برای اطمینان از عملکرد این ژن، بیان ژن MMP1 (NC\_005107.4) که از ژن‌های پایین دستی در مسیر عملکرد VEGF است، اندازه‌گیری شد. محاسبات با روش  $\Delta\Delta CT$  انجام شد. استخراج RNA و سنتز cDNA مطابق روش بالا انجام شد. توالی آغازگرها بدین ترتیب است.

VEGF F: TGAGGAGTCCAACATCACCATG  
MMP1 VEGF R: CAAGGCCACAGGGATTTT  
MMP1 F: AGGGGAGAGGTGATGTTCTTTAAAG  
ACTB F: R: AGCAGCATCAAGTTTACCTGGC  
ACTB R: GCAGAAGAACGGCATCAAGG  
TGCTCAGGTA GTGTTGTCGG

## تیمار سلول‌های بنیادی مزانشیمی حاوی VEGF با SDF1 $\alpha$

سلول‌ها در دو گروه تیمار و کنترل تقسیم‌بندی شدند. گروه تیمار با میزان ۰/۰۵ میکروگرم در میلی‌لیتر SDF1 $\alpha$  رتی از شرکت Sigma آلمان به مدت دو ساعت و چهار ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد تیمار شد و تأثیر آن بررسی و از این طریق بهترین زمان تیمار محاسبه شد.

از تأیید قطعه ۵۷۴ بازی محصول PCR و برش محصول PCR مورد نظر از میان واریانت‌های مختلف این ژن، همسانه‌سازی (Cloning) در ناقل pTZ57R/T T (Fermentas، آمریکا) انجام شد. پس از آن برش آنزیمی انجام شده و قطعه مورد نظر در ناقل لنتی ویروسی p240 که نسخه تغییر یافته از pLOXEWGFP است کلون شد. این ناقل دارای توالی IRES بعد از منطقه همسانه‌سازی و قبل از ژن GFP است. بر اساس این طراحی اگر بیان ژن GFP در سلول‌ها که با مشاهده رنگ سبز در زیر میکروسکوپ فلورسانس مشخص می‌شود، دیده شود تأیید کننده بیان ژن کلون شده قبل از آن است. پس از تأیید همسانه‌سازی تعیین توالی به منظور تأیید قطعه کلون شده انجام شد.

## انتقال ژن VEGF به سلول‌های بنیادی مزانشیمی

ابتدا پلاسمید لنتی ویروسی p240 به همراه پلاسمیدهای pMD2.G و pSPAX با استفاده از لیپوفکتامین ۲۰۰۰ (Lipofectamine 2000) (Invitrogen، آمریکا) طبق دستورالعمل به سلول‌های HEK293 (از انستیتو پاستور) انتقال یافت. پس از ۶ ساعت محیط روی سلول‌ها با ۱۰ میلی‌لیتر DMEM حاوی سرم و آنتی‌بیوتیک عوض شد. روز بعد پتری‌دیش‌ها زیر میکروسکوپ فلورسانس بررسی شد. پیام سبز در سلول‌ها دیده شد که نشان‌دهنده ترانسفکشن است که هرچه تعداد سلول‌های ترانسفکت شده بیشتر باشد نشان‌دهنده کارایی بالاتر است. سه بار هرکدام به مدت ۲۴ ساعت محیط روی سلول‌ها که حاوی ویروس است را در فالتون در یخچال نگهداری و روی سلول‌ها محیط تازه اضافه شد. برای پلاسمید p240 حاوی ژن نیز این کار تکرار شد. پس از اتمام جمع‌آوری ویروس در روز سوم سوسپانسیون سلولی در ۱۵۰۰ دور به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ شد و محلول رویی از فیلتر ۰/۴۵ میکرون عبور داده شد. این ویروس‌ها برای ترانسداکشن (Transduction) سلول‌های مزانشیمی آماده هستند. در مرحله

## بررسی تأثیر SDF1 $\alpha$ روی سلول‌های بنیادی مزانشیمی

به این منظور میزان بیان ژن لاکتات دهیدروژناز (LDH) سلول‌های تیمار شده با SDF1 $\alpha$  در مقایسه با گروه تیمار نشده با استفاده از کیت شرکت پارس آزمون طبق دستورالعمل شرکت سازنده اندازه‌گیری شد. از سلول‌های تیمار شده با PBS به‌عنوان کنترل استفاده شد. این آنزیم در اثر آسیب سلولی آزاد می‌شود. آسیب سلولی در محیط کشتی که در اثر پر شدن فلاسک از سلول، دچار کمبود مواد مغذی است و حاوی متابولیت‌های آزاد شده از سلول‌های در حال رشد است، بیشتر است. کمتر بودن میزان لاکتات دهیدروژناز نشان‌دهنده بقای بیشتر این سلول‌ها در چنین محیط‌هایی است. همچنین قابلیت زیستی سلول‌ها با استفاده از رنگ‌آمیزی توسط تریپان بلو (Trypan blue) و تعیین درصد سلول‌های زنده به‌دست آمد و در دو گروه مقایسه شد.

## تجزیه و تحلیل آماری

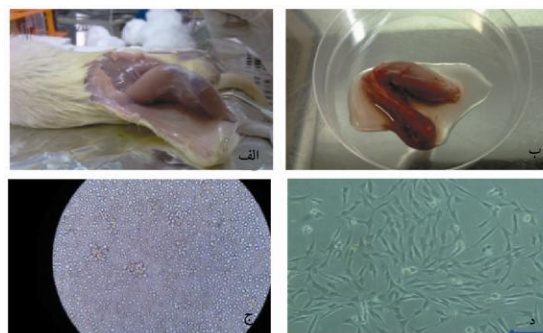
تجزیه و تحلیل‌های آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۸ انجام شد. برای بررسی معنی‌داری دو گروه از آزمون T و بیش از دو گروه از آزمون آنالیز واریانس یک طرفه (one-way Analysis of Variance: ANOVA) استفاده شد. نمودارها با استفاده از نرم‌افزار Graph Pad Prism نسخه ۵ رسم شد.

## نتایج

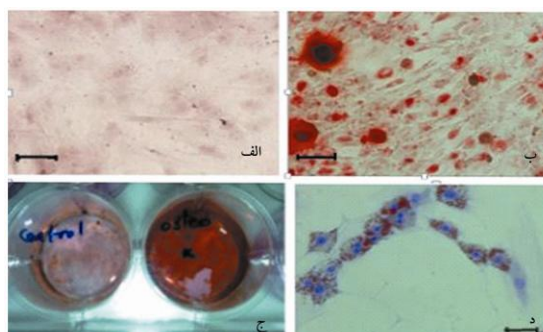
### استخراج و کشت سلول‌های بنیادی مغز

#### استخوان

همان‌طور که در شکل ۱ مشخص است، سلول‌های بنیادی مغز استخوان جداسازی شد و نتایج بنیادی بودن به شرح زیر است.



شکل ۱ استخراج MSC ها؛ الف و ب) جداسازی سلول‌ها استخوان فمور و تیبیا، ج) سلول‌های مغز استخوان بلافاصله پس از جداسازی، د) سلول‌های مزانشیمی در پاساژ دوم، مقیاس ۱۰۰ میکرومتر



شکل ۲ تمایز استخوانی و چربی؛ الف) سلول کنترل بدون محیط تمایزی، ب) سلول با محیط تمایزی استخوان، رنگ قرمز معدنی شدن را نشان می‌دهد. ج) نمای ماکروسکوپی از الف و ب، د) واکوئل‌های چربی به رنگ قرمز مشخص شده است. هسته‌ها به رنگ آبی، مقیاس ۲۵ میکرومتر

## تأیید سلول‌های بنیادی مزانشیمی

### تمایز به سلول استخوانی

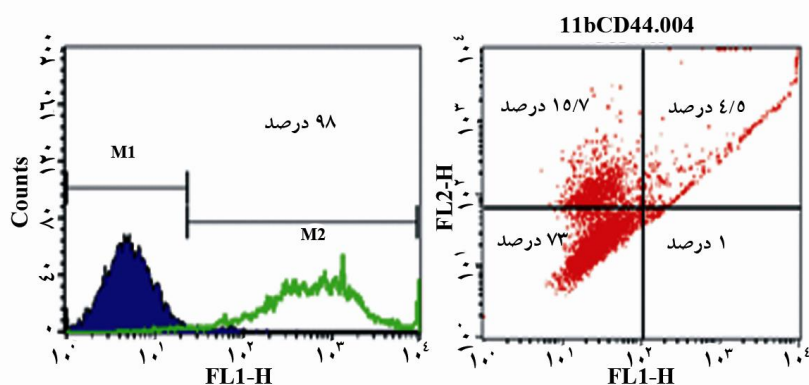
پس از پایان تمایز به سلول استخوان و رنگ‌آمیزی، سلول‌ها مانند شکل ۲ قابل مشاهده بود. رنگ‌آمیزی سلول‌ها تمایز استخوانی را تأیید می‌کند.

### تمایز به سلول چربی

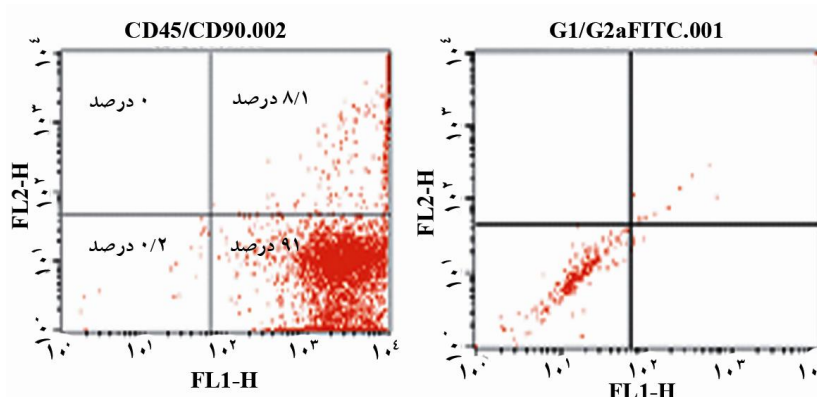
سلول‌های متمایز شده به چربی به رنگ قرمز مشخص شد و واکوئل‌های چربی در آن‌ها دیده می‌شود (شکل ۲).

## فلوسایتومتری نشانگرهای سطحی

نتایج فلوسایتومتری برای نشانگرهای سطحی CD90، CD45، CD29 و CD11b در شکل‌های ۳ و ۴ مشخص است. در این سلول‌ها با توجه به نتیجه فلوسایتومتری نشانگرهای CD90 و CD29 هرکدام به ترتیب با ۹۱/۶ و ۹۸/۷ درصد از سلول‌ها به عنوان نشانگر مثبت و CD45 و CD11b با ۸/۱ و ۴/۵ درصد از سلول‌ها به عنوان نشانگر منفی تأیید شد. بیان عدم بیان این نشانگرها در سلول‌های مزانشیمی مغز استخوان تأیید کننده درستی جداسازی آن‌ها است.



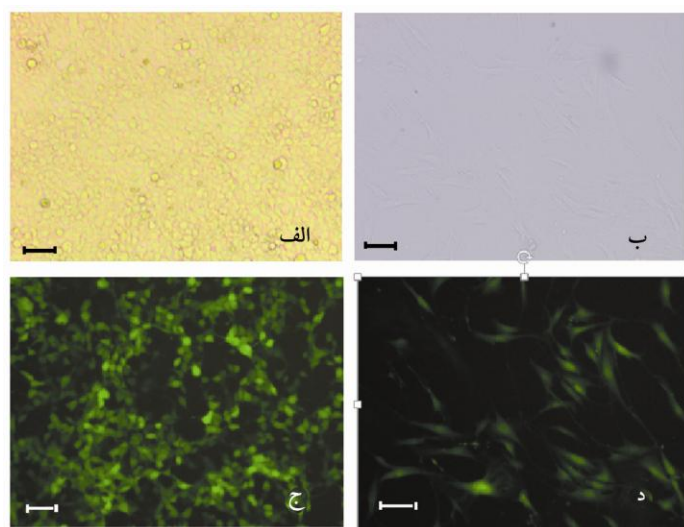
شکل ۳ فلوسایتومتری نشانگرهای سطحی CD90 و CD45؛ درصد سلول‌های CD90 مثبت برابر با ۹۱/۶ درصد در ربع چپ سمت چپ پایین و CD45 ۸ درصد (منفی) ربع چپ بالا، آنتی‌بادی‌ها G1 و G2a به عنوان ایزوتایپ استفاده شد.



شکل ۴ فلوسایتومتری نشانگرهای سطحی CD44 و CD11b؛ درصد سلول‌های CD44 مثبت برابر با ۹۸/۷ درصد M2 و CD11b ۴/۵ درصد (منفی) ربع راست بالا



## ایجاد سلول‌های بنیادی مزانشیمی بیان کننده ژن VEGF-A



شکل ۷ ترانسفکشن و ترانسداکشن؛ الف) سلول‌های HeK ترانسفکت شده، ب) سلول‌های مزانشیمی ترانسداکت شده، ج و د) نمای میکروسکوپ فلورسانس سلول‌های HeK و مزانشیمی ترانسداکت و ترانسفکت شده، مقیاس ۱۰۰ میکرومتر

جدول ۱ میزان CT ژن VEGF و ACTB؛ در سلول‌های حاوی این ژن و سلول کنترل حاوی ناقل Diff نشان‌دهنده تفاوت CT ژن مورد نظر به ژن کنترل در هر نمونه است. NA به معنی عدم تکثیر است.

| نوع سلول | ACTB CT | VEGF CT | تفاوت CT |
|----------|---------|---------|----------|
| MSC+VEGF | ۲۰/۰    | ۲۶/۹    | ۶/۳      |
|          | ۱۹/۹    | ۲/۲۶    | ۵/۸      |
|          | ۱۹/۹    | ۲۶/۹    | ۶/۵      |
| MSC+p240 | ۲۰/۵    | NA      | -        |
|          | ۲۰/۴    | NA      | -        |
|          | ۲۰/۴    | NA      | -        |

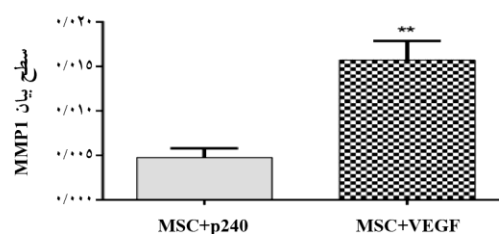
همان‌طور که در شکل ۸ مشخص است میزان بیان MMP1 در سلول‌های حاوی VEGF نسبت به کنترل افزایش معنی‌داری دارد که تأیید کننده فعال بودن پروتئین تولید شده از ژن VEGF است. اختلاف بیان معنی‌دار ژن در نمودار شکل ۸ در این دو گروه نسبت به هم بیش از سه برابر است (۰/۰۰۵) در برابر (۰/۰۱۵). کم بودن عدد بیان به علت بالا بودن بیان ژن خانه‌دار ACTB نسبت به MMP1 است.

## میزان بیان ژن لاکتات دهیدروژناز (LDH) در

### سلول‌های تیمار شده با SDF1α

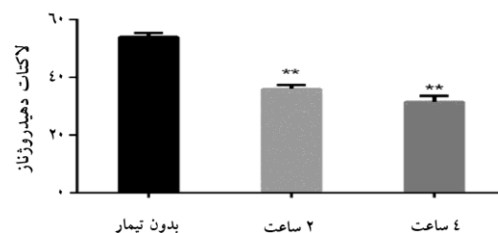
همان‌طور که در شکل ۹ مشخص است، میزان LDH در

لازم به ذکر است در این جدول، از آنجایی که این ژن در سلول کنترل بیان نشد، مقادیر به صورت خام گزارش شد و به صورت تغییرات میزان بیان گزارش نشد.



شکل ۸ میزان بیان ژن MMP1؛ در نمونه کنترل و نمونه تیمار شده با SDF1α. \*\* P≤۰/۰۱

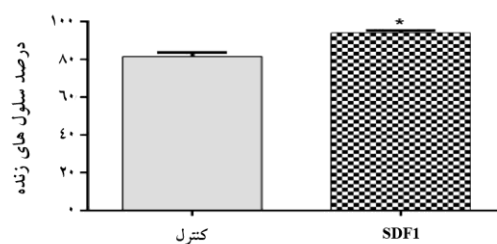
سلول‌های تیمار شده با این کموکاین در زمان دو ساعت و چهار ساعت به‌طور معنی‌داری کمتر از سلول‌های تیمار نشده است. زمان چهار ساعت از زمان دو ساعت تأثیر بیشتری روی سلول‌ها داشت.



شکل ۹ میزان بیان ژن لاکتات دهیدروژناز؛ در سلول‌های تیمار شده دو و چهار ساعت با  $SDF1\alpha$ . \*\*  $P \leq 0.01$

## میزان بقای سلول‌های مزانشیمی تیمار شده با $SDF1\alpha$

همان‌طور که در شکل ۱۰ مشخص است، میزان بقای سلول‌ها در نمونه تیمار شده نسبت به کنترل به‌طور معنی‌داری بیشتر است.



شکل ۱۰ درصد سلول‌های مزانشیمی زنده هنگام تیمار با  $SDF1\alpha$  در مقایسه با نمونه کنترل تیمار؛ سلول‌های تیمار شده بیشتر از سلول‌های کنترل زنده مانده‌اند. \*  $P \leq 0.05$

## بحث

در این مطالعه سلول‌های بنیادی مزانشیمی از مغز استخوان رت جداسازی و تأیید شد. سپس ژن VEGF با استفاده از ناقل

ویروسی به آن انتقال یافت و رده سلولی پایدار تشکیل شد. بیان ژن VEGF و به‌منظور تأیید فعال بودن آن، بیان ژن MMP1 ارزیابی شد. نتایج نشان‌دهنده درستی انتقال ژن و فعال بودن آن بود.

در این تحقیق ابتدا در مطالعه سلولی و تیمار سلول‌های MSC با کموکاین  $SDF1\alpha$  کاهش معنی‌داری در بیان لاکتات دهیدروژناز دیده شد. این آنزیم در اثر آسیب سلولی آزاد می‌شود [۱۸]. آسیب سلولی در محیط کشتی که در اثر پر شدن فلاسک از سلول، دچار کمبود مواد مغزی است و حاوی متابولیت‌های آزاد شده از سلول‌های در حال رشد است، بیشتر است. کمتر بودن میزان لاکتات دهیدروژناز در محیط سلول تیمار شده با  $SDF1\alpha$  نشان‌دهنده مرگ کمتر در سلول‌های تیمار شده و در نتیجه اثبات تأثیر این کموکاین در بقای سلول‌های بنیادی است که تقویت‌کننده این مطلب است که این کموکاین باعث بقای بیشتر این سلول‌ها در چنین محیط‌هایی است. همچنین درصد سلول‌های زنده نشان‌دهنده میزان بقای این سلول‌ها در مجاورت این کموکاین است که در این مطالعه سلول‌ها در مجاورت این کموکاین بقای بیشتری نسبت به کنترل داشتند که تیمار چهار ساعت از دو ساعت بهتر بود. از آنجایی که از سلول‌های بنیادی مزانشیمی برای درمان بیماری‌ها از جمله سکته قلبی استفاده می‌شود، مرگ آن‌ها پس از انتقال به بافت زیاد است. بسته شدن عروق در هنگام سکته قلبی منجر به کم شدن مواد غذایی و جمع شدن رادیکال‌های آزاد می‌شود که تهدیدی برای بقای سلول‌های بنیادی پیوند شده است. این نتیجه با نتایج پاشا (Pasha) و همکاران همخوانی دارد. آن‌ها نشان دادند که تیمار سلول‌های MSC با  $SDF1\alpha$  باعث افزایش بقای این سلول‌ها از طریق مسیر پیام‌رسانی Akt می‌شود [۱۹].

مطالعات دیگر انجام شده در استفاده از این پروتئین‌ها متفاوت بوده‌است. برای مثال چن (Chen) و همکاران با افزایش بیان گیرنده  $SDF1\alpha$  در سلول‌های بنیادی مزانشیمی و پس از آن استفاده در مدل حیوانی به این نتیجه رسیده بودند که

## ایجاد سلول‌های بنیادی مزانشیمی بیان کننده ژن VEGF-A

این کموکاین باعث بدتر شدن عملکرد قلب می‌شود [۲۰]. در مقابل برخی مطالعات دیگر، اثر مثبت این کموکاین را گزارش کرده‌است [۲۱، ۲۲]. همچنین تزریق سیستمیک سلول‌های MSC که SDF1 $\alpha$  را بیش بیان کرده بود، یک روز پس از سکته قلبی در رت باعث افزایش رگ‌زایی و افزایش بقای کاردیومیوسیت‌ها از طریق افزایش لانه‌گزینی سلول‌های بنیادی مزانشیمی به بافت دچار سکته شد [۱۲]. استفاده از بیش بیان SDF1 $\alpha$  توسط آدنو ویروس ۴ ساعت پس از سکته قلبی در موش‌هایی که سلول‌های مغز استخوان دریافت کرده بودند باعث افزایش فراخوانی سلول‌های مغز استخوان به ناحیه سکته شده بود [۹]. پس در نتیجه با توجه به مطالعات ذکر شده و برخی مطالعات دیگر، اثر مثبت این کموکاین از طریق افزایش لانه‌گزینی، بقا و تکثیر سلول‌های بنیادی، بازسازی کاردیومیوسیت‌ها، آنژیوژنز و بازسازی بطن اتفاق می‌افتد [۲۳، ۲۴]. در مطالعات دیگری گزارش شده است که افزایش بیان این کموکاین یا گیرنده آن در سلول‌های مزانشیمی باعث افزایش لانه‌گزینی سلول‌های پیش‌ساز می‌شود و پس از استفاده در مدل حیوانی منجر به افزایش چگالی عروقی، افزایش عملکرد قلب پس از سکته قلبی و کاهش وسعت زخم می‌شود [۹، ۱۲، ۲۵]. در سلول‌های این مطالعه علاوه بر پیش تیمار، ژن VEGF نیز به منظور افزایش رگ‌زایی ترانسداکت شده است. این ترکیب برای مطالعات بعدی حیوانی در مدل رتی سکته قلبی توصیه می‌شود. در مطالعاتی که روی ژن VEGF انجام شده است، مشخص شده است که این ژن از طریق مهار مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده (Apoptosis) منجر به پایداری مویرگ‌ها میوسیت‌های قلبی تازه شکل گرفته می‌شود [۲۶]. پیام‌رسانی VEGF-A باعث تکثیر و تمایز سلولی به عروق خونی هنگام تکوین یا تأمین ذخیره خونی به بافت ایسکمیک (Ischemic) می‌شود. همچنین شرایط کمبود اکسیژن باعث افزایش بیان در سطح رونویسی و ترجمه از این ژن می‌شود که از طریق عامل رونویسی HIF1- $\alpha$  (Hypoxia-inducible Factor 1- $\alpha$ ) انجام می‌شود [۲۷، ۲۸]. کاهش آن نیاز است.

سطح VEGF-A با مراحل پیشرفته‌تر ناتوانی قلبی و رشد ناکافی مویرگ‌های کوچک و کاهش مویرگ‌ها همراه است [۲۹]. تحقیقات نشان می‌دهد که VEGF-A از طریق مهار مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده منجر به پایداری مویرگ‌ها میوسیت‌های قلبی تازه شکل گرفته می‌شود [۲۶]. همچنین تزریق سیستمیک سلول‌های MSC که SDF1 $\alpha$  را بیش بیان کرده بود، یک روز پس از سکته قلبی در رت باعث افزایش رگ‌زایی و افزایش بقای کاردیومیوسیت‌ها از طریق افزایش لانه‌گزینی سلول‌های بنیادی مزانشیمی به بافت دچار سکته شد [۱۲]. استفاده از بیش بیان SDF1 $\alpha$  توسط آدنو ویروس ۴ ساعت پس از سکته قلبی در موش‌هایی که سلول‌های مغز استخوان دریافت کرده بودند باعث افزایش فراخوانی سلول‌های مغز استخوان به ناحیه سکته شده بود [۹]. پس در نتیجه با توجه به مطالعات ذکر شده و برخی مطالعات دیگر، اثر مثبت این کموکاین از طریق افزایش لانه‌گزینی، بقا و تکثیر سلول‌های بنیادی، بازسازی کاردیومیوسیت‌ها، آنژیوژنز و بازسازی بطن اتفاق می‌افتد [۲۳، ۲۴]. در مطالعات دیگری گزارش شده است که افزایش بیان این کموکاین یا گیرنده آن در سلول‌های مزانشیمی باعث افزایش لانه‌گزینی سلول‌های پیش‌ساز می‌شود و پس از استفاده در مدل حیوانی منجر به افزایش چگالی عروقی، افزایش عملکرد قلب پس از سکته قلبی و کاهش وسعت زخم می‌شود [۹، ۱۲، ۲۵]. در سلول‌های این مطالعه علاوه بر پیش تیمار، ژن VEGF نیز به منظور افزایش رگ‌زایی ترانسداکت شده است. این ترکیب برای مطالعات بعدی حیوانی در مدل رتی سکته قلبی توصیه می‌شود. در مطالعاتی که روی ژن VEGF انجام شده است، مشخص شده است که این ژن از طریق مهار مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده (Apoptosis) منجر به پایداری مویرگ‌ها میوسیت‌های قلبی تازه شکل گرفته می‌شود [۲۶]. پیام‌رسانی VEGF-A باعث تکثیر و تمایز سلولی به عروق خونی هنگام تکوین یا تأمین ذخیره خونی به بافت ایسکمیک (Ischemic) می‌شود. همچنین شرایط کمبود اکسیژن باعث افزایش بیان در سطح رونویسی و ترجمه از این ژن می‌شود که از طریق عامل رونویسی HIF1- $\alpha$  (Hypoxia-inducible Factor 1- $\alpha$ ) انجام می‌شود [۲۷، ۲۸]. کاهش آن نیاز است.

## تشکر و قدردانی

بدین وسیله از جناب آقای دکتر یوسف قیصری به دلیل راهنمایی و در اختیار قرار دادن آزمایشگاه سلول بافت زیست

برای انجام کار ویروسی و همچنین سرکار خانم دکتر فاطمه جمشیدی آدگانی به علت زحمات و راهنمایی جهت انجام ترانسفکشن ویروسی نهایت سپاس را داریم.

## منابع

- [1] Nesselmann C, Ma N, Bieback K, Wagner W, Ho A, Konttinen YT, Zhang H, Hinescu ME, Steinhoff G. Mesenchymal stem cells and cardiac repair. *J Cell Mol Med* 2008; 12(5B): 1795-810.
- [2] Toma C, Wagner WR, Bowry S, Schwartz A, Villanueva F. Fate of culture-expanded mesenchymal stem cells in the microvasculature: in vivo observations of cell kinetics. *Circ Res* 2009; 104(3): 398-402.
- [3] Rosová I, Dao M, Capoccia B, Link D, Nolta JA. Hypoxic preconditioning results in increased motility and improved therapeutic potential of human mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 2008; 26(8): 2173-82.
- [4] Song H, Song BW, Cha MJ, Choi IG, Hwang KC. Modification of mesenchymal stem cells for cardiac regeneration. *Expert Opin Biol Ther* 2010; 10(3): 309-19.
- [5] Degeorge BR Jr, Rosenberg M, Eckstein V, Gao E, Herzog N, Katus HA, Koch WJ, Frey N, Most P. BMP-2 and FGF-2 synergistically facilitate adoption of a cardiac phenotype in somatic bone marrow c-kit+/Sca-1+ stem cells. *Clin Transl Sci* 2008; 1(2): 116-25.
- [6] Symes JF, Losordo DW, Vale PR, Lathi KG, Esakof DD, Mayskiy M, Isner JM. Gene therapy with vascular endothelial growth factor for inoperable coronary artery disease. *Ann Thorac Surg* 1999; 68(3): 830-6; discussion 836-7.
- [7] Fortuin FD, Vale P, Losordo DW, Symes J, DeLaria GA, Tyner JJ, Schaer GL, March R, Snell RJ, Henry TD, Van Camp J, Lopez JJ, Richenbacher W, Isner JM, Schatz One-year follow-up of direct myocardial gene transfer of vascular endothelial growth factor-2 using naked plasmid deoxyribonucleic acid by way of thoracotomy in no-option patients. *Am J Cardiol* 2003; 92(4): 436-9.
- [8] Vale PR, Losordo DW, Milliken CE, Maysky M, Esakof DD, Symes JF, Isner JM. Left ventricular electromechanical mapping to assess efficacy of phVEGF(165) gene transfer for therapeutic angiogenesis in chronic myocardial ischemia. *Circulation* 2000; 102(9): 965-74.
- [9] Abbott JD, Huang Y, Liu D, Hickey R, Krause DS, Giordano FJ. Stromal cell-derived factor-1alpha plays a critical role in stem cell recruitment to the heart after myocardial infarction but is not sufficient to induce homing in the absence of injury. *Circulation* 2004; 110(21): 3300-5.
- [10] Askari AT, Unzek S, Popovic ZB, Goldman CK, Forudi F, Kiedrowski M, Rovner A, Ellis SG, Thomas JD, DiCorleto PE, Topol EJ, Penn MS. Effect of stromal-cell-derived factor 1 on stem-cell homing and tissue regeneration in

- ischaemic cardiomyopathy. *Lancet* 2003; 362(9385): 697-703.
- [11] Zhang D, Fan GC, Zhou X, Zhao T, Pasha Z, Xu M, Zhu Y, Ashraf M, Wang Y. Over-expression of CXCR4 on mesenchymal stem cells augments myoangiogenesis in the infarcted myocardium. *J Mol Cell Cardiol* 2008; 44(2): 281-92.
- [12] Zhang M, Mal N, Kiedrowski M, Chacko M, Askari AT, Popovic ZB, Koc ON, Penn MS. SDF-1 expression by mesenchymal stem cells results in trophic support of cardiac myocytes after myocardial infarction. *FASEB J* 2007; 21(12): 3197-207.
- [13] Gyöngyösi M, Khorsand A, Zamini S, Sperker W, Strehlow C, Kastrup J, Jorgensen E, Hesse B, Tägil K, Bøtker HE, Ruzyllo W, Teresińska A, Dudek D, Hubalewska A, Rück A, Nielsen SS, Graf S, Mundigler G, Novak J, Sochor H, Maurer G, Glogar D, Sylven C. NOGA-guided analysis of regional myocardial perfusion abnormalities treated with intramyocardial injections of plasmid encoding vascular endothelial growth factor A-165 in patients with chronic myocardial ischemia: subanalysis of the EUROINJECT-ONE multicenter double-blind randomized study. *Circulation* 2005; 112(9 Suppl): I157-65.
- [14] Stewart DJ, Kutryk MJ, Fitchett D, Freeman M, Camack N, Su Y, Della Siega A, Bilodeau L, Burton JR, Proulx G, Radhakrishnan S; NORTHERN Trial Investigators. VEGF gene therapy fails to improve perfusion of ischemic myocardium in patients with advanced coronary disease: results of the NORTHERN trial. *Mol Ther* 2009; 17(6): 1109-15.
- [15] Chu PY, Mariani J, Finch S, McMullen JR, Sadoshima J, Marshall T, Kaye DM. Bone marrow-derived cells contribute to fibrosis in the chronically failing heart. *Am J Pathol* 2010; 176(4): 1735-42.
- [16] Proulx C, El-Helou V, Gosselin H, Clement R, Gillis MA, Villeneuve L, Calderone A. Antagonism of stromal cell-derived factor-1alpha reduces infarct size and improves ventricular function after myocardial infarction. *Pflugers Arch* 2007; 455(2): 241-50.
- [17] Mendiz O, Favaloro L, Diez M, Valdivieso L, Bercovich A, Criscuolo M, Vera Janavel G, Crottogini A. High-dose plasmid vegf gene transfer in patients with severe coronary artery disease: final results of the first latin american trial of gene therapy in myocardial ischemia. *Circulation* 2011; Available at: [http://circ.ahajournals.org/cgi/content/meeting\\_abstract/124/21\\_MeetingAbstracts/A15235](http://circ.ahajournals.org/cgi/content/meeting_abstract/124/21_MeetingAbstracts/A15235)
- [18] Chan FK, Moriwaki K, De Rosa MJ. Detection of necrosis by release of lactate dehydrogenase activity. *Methods Mol Biol* 2013; 979: 65-70.
- [19] Pasha Z, Wang Y, Sheikh R, Zhang D, Zhao T, Ashraf M. Preconditioning enhances cell survival and differentiation of stem cells during transplantation in infarcted myocardium. *Cardiovasc Res* 2008; 77(1): 134-42.
- [20] Chen J, Chemaly E, Liang L, Kho C, Lee A, Park J, Altman P, Schecter AD, Hajjar RJ, Tarzami ST. Effects of CXCR4 gene transfer on cardiac function after ischemia-reperfusion injury. *Am J Pathol* 2010; 176(4): 1705-15.
- [21] Frangogiannis NG. The stromal cell-derived factor-1/CXCR4 axis in cardiac injury and repair. *J Am Coll Cardiol* 2011; 58(23): 2424-6.

- [22] Ghadge SK, Mühlstedt S, Ozcelik C, Bader M. SDF-1 $\alpha$  as a therapeutic stem cell homing factor in myocardial infarction. *Pharmacol Ther* 2011; 129(1): 97-108.
- [23] Takahashi M. Role of the SDF-1/CXCR4 system in myocardial infarction. *Circ J* 2010; 74(3): 418-23.
- [24] Zaruba MM, Franz WM. Role of the SDF-1-CXCR4 axis in stem cell-based therapies for ischemic cardiomyopathy. *Expert Opin Biol Ther* 2010; 10(3): 321-35.
- [25] Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T, Witzenbichler B, Schatteman G, Isner JM. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 1997; 275(5302): 964-7.
- [26] Gerber HP, Dixit V, Ferrara N. Vascular endothelial growth factor induces expression of the antiapoptotic proteins Bcl-2 and A1 in vascular endothelial cells. *J Biol Chem* 1998; 273(21): 13313-6.
- [27] Friehs I, Barillas R, Vasilyev NV, Roy N, McGowan FX, del Nido PJ. Vascular endothelial growth factor prevents apoptosis and preserves contractile function in hypertrophied infant heart. *Circulation* 2006; 114(1 Suppl): I290-5.
- [28] Namiki A1, Brogi E, Kearney M, Kim EA, Wu T, Couffinhal T, Varticovski L, Isner JM. Hypoxia induces vascular endothelial growth factor in cultured human endothelial cells. *J Biol Chem* 1995; 270(52): 31189-95.
- [29] Borgers M, Voipio-Pulkki L, Izumo S. Apoptosis. *Cardiovasc Res* 2000; 45(3): 525-7.
- [30] Gerber HP, McMurtrey A, Kowalski J, Yan M, Keyt BA, Dixit V, Ferrara N. Vascular endothelial growth factor regulates endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt signal transduction pathway. Requirement for Flk-1/KDR activation. *J Biol Chem* 1998; 273(46): 30336-43.
- [31] Ruixing Y, Dezhai Y, Hai W, Kai H, Xianghong W, Yuming C. Intramyocardial injection of vascular endothelial growth factor gene improves cardiac performance and inhibits cardiomyocyte apoptosis. *Eur J Heart Fail* 2007; 9(4): 343-51.
- [32] Hoepfner LH, Phoenix KN, Clark KJ, Bhattacharya R, Gong X, Sciuto TE, Vohra P, Suresh S, Bhattacharya S, Dvorak AM, Ekker SC, Dvorak HF, Claffey KP, Mukhopadhyay D. Revealing the role of phospholipase C $\beta$ 3 in the regulation of VEGF-induced vascular permeability. *Blood* 2012; 120(11): 2167-73.
- [33] Weis SM, Cheresh DA. Pathophysiological consequences of VEGF-induced vascular permeability. *Nature* 2005; 437(7058): 497-504.
- [34] Taimeh, Z, Loughran J, Birks EJ, Bolli R. Vascular endothelial growth factor in heart failure. *Nat Rev Cardiol* 2013. 10(9): 519-30.