

# دانشور پژشکی

## ارزیابی توان تمایز سلول‌های بنیادی مشتق از خون قاعدگی به سلول‌های قلبی در شرایط آزمایشگاهی

نویسندگان: مریم رحیمی<sup>۱،۲</sup>، امیرحسین زرنانی<sup>۳،۴</sup>، هما محسنی کوچصفهانی<sup>۲</sup>،  
سمیه کاظم‌نژاد<sup>۵\*</sup>

۱. دانشگاه ملایر، دانشکده علوم، گروه زیست‌شناسی، ملایر، ایران
۲. دانشگاه خوارزمی تهران، دانشکده علوم زیستی، گروه علوم جانوری، تهران، ایران
۳. پژوهشکده نانوبیوتکنولوژی پژوهشگاه فناوری‌های نوین علوم زیستی جهاد دانشگاهی،  
ابن‌سینا، تهران، ایران
۴. مرکز تحقیقات ایمونولوژی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران
۵. گروه پژوهشی مهندسی بافت پژوهشگاه فناوری‌های نوین علوم زیستی جهاد دانشگاهی،  
ابن‌سینا، تهران، ایران

E-mail: kazemnejad\_s@yahoo.com

\* نویسنده مسئول: سیمیه کاظم‌نژاد

### چکیده

مقدمه و هدف: در دهه‌های اخیر، سلول‌های بنیادی به‌عنوان یک روش درمانی جدید برای بیماران مبتلا به اختلالات قلبی معرفی شده است. به‌تازگی شناسایی سلول‌های بنیادی مشتق از خون قاعدگی به‌عنوان یک منبع منحصربه‌فرد از سلول‌های بنیادی با برخی خصوصیات مثل سهولت دسترسی، توانایی تکثیر و خودتجدیدی بالا، امید فراوانی را برای سلول‌درمانی ایجاد کرده است. در این مطالعه، توانایی تمایز این سلول‌ها به کاردیومیوسیت بررسی شده است.

مواد و روش‌ها: بعد از بررسی مارکرهای سطحی این سلول‌ها تمایز آن‌ها به سلول‌های شبه کاردیومیوسیت در حضور ۵- آزاسیتیدین و فاکتور رشد فیبروبلاستی بررسی شد. سپس بیان سلول‌های تمایزی در سطح پروتئین و mRNA به‌وسیله رنگ‌آمیزی ایمونوفلورسنت و real-time quantitative PCR بررسی گردید.

نتایج: براساس آنالیز فلوسایتومتری، این سلول‌ها به‌طور معمول، مارکرهای سلول‌های بنیادی مزانشیمی شبیه CD105، CD44، CD73 و CD166 همچنین OCT-4 به‌عنوان یک مارکر جنینی را بیان کردند. سلول‌های تمایز داده‌شده، مارکرهای سلول‌های کاردیومیوسیتی را در سطح mRNA و پروتئین بیان کردند. سلول‌های کاردیومیوسیت تمایز یافته از این سلول‌ها برای پروتئین Connexin-43 و troponin T2 (TNNT2) مثبت بودند. همچنین mRNA، Connexin-40، Connexin-43، Alpha actinin، Tropomyosin1 و TNNT2 در سطح بالایی در سلول‌های تمایزی بیان گردید.

نتیجه‌گیری: براساس داده‌های ما سلول‌های بنیادی مشتق از خون قاعدگی، جمعیت سلولی منحصربه‌فردی هستند که توانایی تمایز به سلول‌هایی با ویژگی‌هایی که به‌طور معمول، به سلول‌های کاردیومیوسیت نسبت داده می‌شود دارند.

واژگان کلیدی: خون قاعدگی، سلول بنیادی، کاردیومیوسیت، تمایز

دوماهنامه علمی-پژوهشی  
دانشگاه شاهد  
سال بیست‌وسوم-شماره ۱۲۳  
تیر ۱۳۹۵

دریافت: ۱۳۹۵/۰۲/۳۱  
آخرین اصلاح‌ها: ۱۳۹۵/۰۳/۰۵  
پذیرش: ۱۳۹۵/۰۳/۱۱

## مقدمه

از جمله مشکلاتی که امروزه جامعه انسانی با آن مواجه است، بیماری‌های قلبی-عروقی است. کاردیومیوسیت‌های قلبی، سلول‌های پس‌میتوزی می‌باشند که بعد از تولد توانایی تکثیر خود را از دست می‌دهند. بعد از وقوع سکته قلبی، کاردیومیوسیت‌ها نکروزه گشته و به وسیله سلول‌های غیرانقباضی فیبروبلاستی جایگزین شده و در محل آسیب، بافت اسکار تشکیل می‌گردد (۴-۱)؛ لذا یافتن مخزن سلولی در دسترس که بتواند در صورت نیاز، به کاردیومیوسیت یا بافت قلبی متمایز شوند و به محل آسیب‌دیده تزریق یا پیوند شوند، تحولی شگرف را در درمان این بیماران فراهم خواهد نمود (۶، ۵). اخیراً با توجه به ماهیت سلول‌های بنیادی استفاده از روش‌های سلول‌درمانی در بیماری‌های قلبی گسترش یافته است. یک منبع ایده‌آل برای سلول‌های بنیادی مورد استفاده در بیماری‌های قلبی، باید دارای ویژگی‌های خاص همچون راحتی در جمع‌آوری سلول‌ها، امکان تکثیر، عدم تحریک پاسخ‌های ایمنی، مقاومت در مقابل شرایط ایسکمیک و توانایی تمایز به سلول‌های دارای عملکرد قلبی باشد. متأسفانه هنوز منبع بسیار مناسبی برای سلول‌درمانی در بیماری‌های قلبی شناخته نشده است. در حال حاضر، مغز استخوان انسان در دسترس‌ترین و متداول‌ترین منبع سلول‌های بنیادین بالغ می‌باشد (۷). لیکن در استفاده از این سلول‌ها نیز با مشکلاتی روبه‌رو هستیم که از بین آن‌ها به عدم دسترسی آسان، تهاجمی بودن روش نمونه‌گیری و پایین بودن ظرفیت پتانسیل تکثیری سلول‌های بنیادین بالغ در مقایسه با سلول‌های بنیادین جنینی می‌توان اشاره کرد؛ بنابراین، در حال حاضر با توجه به اهداف بالینی استفاده از سلول‌های بنیادین نیاز به منبعی از سلول‌های بنیادین که محدودیت‌های ذکر شده را برطرف سازد وجود دارد (۸). اخیراً مشخص شده که خون قاعدگی شامل جمعیت منحصر به فردی از سلول‌ها با خصوصیات مشابه با سلول‌های بنیادین بالغ، تحت عنوان سلول‌های بنیادی مشتق از خون قاعدگی

است (۹، ۱۰). توانایی بالای ترمیم بافت اندومتر رحم انسان در سیکل تکثیر سلولی، تمایز و ریزش بافت اندومتر یک مدرک روشن برای حمایت از این فرضیه است (۱۱). سلول‌های بنیادی مشتق از خون قاعدگی توانایی خودتجدیدی طولانی‌مدت و رشد بسیار بالاتری را در مقایسه با سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از خون بند ناف نشان می‌دهند؛ به علاوه ریسک ناهنجاری‌های کاریوتیپی و توانایی تشکیل تومور این سلول‌ها بسیار کم است (۱۳، ۱۲). مطالعات قبلی ما نشان داد که این سلول‌ها مورفولوژی شبیه به سلول‌های مزانشیمی دارند، اما علاوه بر بیان مارکرهای سلول‌های بنیادی مزانشیمی برخی از مارکرهای سلول‌های بنیادی جنینی مثل OCT-4 را نیز بیان می‌کنند؛ به علاوه ما نشان دادیم که این سلول‌ها فعالیت immunomodulatory و توانایی تمایز به برخی از رده‌های سلولی مثل استئوبلاست، کندروسیت و هیپاتوسیت را دارند (۱۸-۱۴). این ویژگی‌ها همچنین فراوانی و دسترسی آسان و غیرتهاجمی بودن روش نمونه‌گیری خون قاعدگی را به عنوان یک منبع سلول بنیادی مناسب جهت سلول‌درمانی و مهندسی بافت قلب معرفی می‌کند. از آنجایی که ممکن است سلول‌های بنیادی تمایز نیافته که به بدن پیوند می‌شوند، به‌طور خودبه‌خودی، به چندین رده سلولی متمایز شوند، بدیهی است تمایز سلول‌های بنیادی به سلول‌های شبیه کاردیومیوسیت در محیط کشت قبل از پیوند می‌تواند نتایج بهتری را در ترمیم بافت قلبی و بازگشت عملکرد قلب داشته باشد. در این زمینه چندین فاکتور رشد شامل فاکتورهای رشد platelet-derived transforming-growth-factor- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) growth factor (PDGF)، growth factor (bFGF)، همچنین ترکیبات شیمیایی از قبیل 5-azacytidine، retinoic acid و dimethylsulfoxide (DMSO) برای القای تمایز کاردیومیوسیتی انواعی از سلول‌های بنیادی استفاده شده‌اند (۱۹-۲۲). مطالعات اخیر شواهدی را برای پتانسیل تمایزی سلول‌های مشتق از خون قاعدگی

در هم‌کشتی با سلول‌های کاردیومیوسیت جنینی موش و استفاده از 5-azacytidine به همراه گلو تاماکس نشان دادند (۱۲ و ۲۳). اطلاعات کمی دربارهٔ تمایز این سلول‌ها به کاردیومیوسیت در حضور فاکتورهای رشد و سیتوکین‌ها در محیط کشت وجود دارد. هدف اصلی از مطالعه حاضر یافتن ترکیبی از فاکتورهای رشد مناسب برای تمایز کاردیومیوسیتی سلول‌های بنیادی مشتق از خون قاعدگی بود. برای رسیدن به این هدف، دو فاکتور مهم درگیر در تمایز کاردیومیوسیتی 5-Azacytidin و bFGF در ترکیب با درصد کمی از سرم در محیط کشت استفاده گردید.

## مواد و روش‌ها

### ۱. جداسازی و کشت سلول‌های بنیادی مشتق از خون قاعدگی انسان

افراد اهداکنندهٔ خون قاعدگی از خانم‌های سالم با متوسط سن بین ۲۲ تا ۳۶ سال انتخاب شدند. تمام اهداکنندگان فرم رضایتنامهٔ تأییدشده توسط کمیتهٔ اخلاق پزشکی پژوهشگاه فناوری‌های نوین علوم پزشکی جهاد دانشگاهی ابن‌سینا با شمارهٔ تأییدیهٔ ۸۹/۲۷۵۴ را امضا کردند. ۵ میلی‌لیتر خون قاعدگی با استفاده از یک Divacup (Diva International Co, Lunette, Finland) استریل در روز دوم سیکل قاعدگی جمع‌آوری شد. خون جمع‌آوری‌شده به یک لولهٔ فالكون استریل شامل ۲/۵ میلی‌گرم / میلی‌لیتر fungizone (Gibco, UK)، ۱۰۰ میلی‌گرم / میلی‌لیتر استرپتومایسین، ۱۰۰ واحد / میلی‌لیتر پنی‌سیلین (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) و ۰/۵ میلی‌مولار EDTA (Gibco) در phosphate buffered saline (PBS) منتقل شد. سلول‌های تک‌هسته‌ای با استفاده از گرادیان غلظت Ficoll-Hypaque (GE-Healthcare, Uppsala, Sweden) جدا شدند. بدین ترتیب که مقدار ۵ میلی‌لیتر فایکول در یک لولهٔ فالكون ۱۵ میلی‌لیتری ریخته شد، سپس هم‌حجم آن از خون جمع‌آوری‌شده، به آرامی به آن اضافه گشته و به مدت بیست دقیقه با دور ۶۰۰g سانتریفیوژ شد. پس از اتمام سانتریفیوژ، چهار لایه

جدا شد که از پایین به بالا عبارت‌اند از: گلبول‌های قرمز، فایکول، حلقهٔ سلول‌های تک‌هسته‌ای و پلاسما. پس از اتمام سانتریفیوژ، لایهٔ سلول‌های تک‌هسته‌ای به آرامی جمع‌آوری شدند و سه بار با PBS به مدت پنج دقیقه با دور ۴۵۰g سانتریفیوژ و شسته شدند. سلول‌های تک‌هسته‌ای به داخل فلاسک کشت ۲۵ cm<sup>2</sup> حاوی محیط کشت 's Medium/Nutrient Mixture F12-Ham Dulbecco's Modified Eagle Fetal bovine serum (FBS) و ۱۵درصد (DMEM-F12)

هر دو از (Sigma) منتقل شدند. سپس فلاسک‌ها در دمای ۳۷°C و ۵درصد CO<sub>2</sub> در انکوباتور انکوبه گردیدند. پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون محیط رویی تعویض شده و به سلول‌های بنیادی که خاصیت چسبندگی دارند، اجازهٔ رشد داده شد. سلول‌ها دو بار در هفته، تعویض محیط شده و پس از آنکه ۸۰ الی ۹۰درصد فلاسک‌ها را پر کردند با استفاده از Trypsin/EDTA (Gibco) پاساژ داده شدند (۱۴).

### ۲. تعیین مارکرهای سطحی سلول‌های بنیادین با روش فلوسایتومتری

به منظور بررسی ماهیت سلول‌های بنیادی مشتق از خون قاعدگی درصد بیان تعدادی از آنتی‌ژن‌های سطح سلولی بنیادی مزانشیمی نظیر CD10، STRO1، CD9، CD29، CD73، CD44 و CD105 و برخی مارکرهای داخل سلولی مرتبط با سلول‌های بنیادی جنینی نظیر OCT-4 در سلول‌های کشت‌داده‌شده در پاساژ ۳ تا ۵ با روش فلوسایتومتری ارزیابی شدند. همچنین به منظور بررسی عدم‌آلودگی سلول‌های هماتوپوئیتیک، بیان مارکرهای اختصاصی این سلول‌ها نظیر CD34، CD38، CD133 و CD45 در سلول‌های کشت‌داده‌شده مورد بررسی قرار گرفت. جهت انجام فلوسایتومتری، ابتدا سلول‌ها تریپسینه شدند و در لولهٔ تست هرکدام ۱۰<sup>۵</sup> سلول ریخته و به مدت هفت دقیقه در دور ۲۰۰g سانتریفیوژ شد. رسوب جداشده در ۲درصد PBS-FBS حل شده و سه بار شسته شدند. سپس سلول‌ها به‌طور جداگانه با آنتی‌بادی‌های مونوکلونال (PE) کانزوگه mouse anti

مشتق از خون قاعدگی، توانایی تمایز آن‌ها به چربی و استخوان و غضروف قبل از ارزیابی توان تمایزی این سلول‌ها به سلول‌های کاردیومیوسیت بررسی گردید. در راستای تمایز به استخوان، سلول‌ها به وسیله محیط DMEM همراه با ۱٪ FBS (Gibco)، ۰/۱ میکرومول دگزامتازون، ۱۰ میکرومول بتا-گلیسروفسفات و ۵۰ میکرومول آسکوربات فسفات همگی از (Sigma) تیمار شدند. بعد از دو هفته سلول‌های کشت داده شده، به وسیله رنگ آمیزی اختصاصی برای کلسیم با کیت رنگ آمیزی Alizarin red (Sigma) بررسی شدند. برای تمایز به غضروف سلول‌ها با محیطی حاوی ۲ درصد FBS (Gibco)، ۱۰۰ میکروگرم/میلی لیتر سدیم پیرووات، ۲۰ نانوگرم/میلی لیتر TGF β3، ۵۰ نانوگرم/میلی لیتر BMP 6، ۱۰۰ نانومول دگزامتازون Premix (۱ ITS+X و ۵۰ میکروگرم/میلی لیتر آسکوربیک اسید (Sigma) تیمار شدند. محیط کشت دو بار در هفته تعویض شد و تمایز به غضروف به وسیله رنگ آمیزی ایمونوفلورسنت برای کلاژن نوع II بررسی گردید. به طور خلاصه، نمونه‌ها با ۰/۴٪ تریتون ۱۰۰-X برای ۲۰ دقیقه نفوذ پذیر شدند و برای یک شب، در ۴°C با آنتی بادی مونوکلونال anti-human Collagen type II (clone 5B2.5, 1:500; Abcam) FITC-labeled goat anti- سپس سلول‌ها با mouse IgG (Abcam) در ۳۷°C برای ۴۵ دقیقه در تاریکی انکوبه شدند. سپس سلول‌ها با DAPI (Sigma) برای رنگ آمیزی هسته‌ها انکوبه گردیدند و با یک میکروسکوپ فلورسنت (Olympus BX51 microscope, Tokyo, Japan) متصل به دوربین دیجیتال (Olympus DP71, Tokyo, Japan) مشاهده شدند. برای تمایز به چربی سلول‌ها با محیط DMEM حاوی ۱۰٪ FBS، ۱ میلی مولار دگزامتازون، ۱۰ میلی گرم/میلی لیتر انسولین، ۰/۵ میلی مولار ۳-ایزوبوتیل-۱-متیل-زانتینیند و ۲۰۰ میلی مولار ایندومتاسین همگی از (Sigma) برای ۲ هفته تیمار شدند. سلول‌های تمایز یافته به چربی برای رنگ آمیزی واکوئل‌های چربی با استفاده از رنگ آمیزی Oil red O (Sigma) رنگ شدند و سپس با میکروسکوپ معکوس (Olympus CKX41, USA) بررسی گردیدند.

human (clone 04-MAR; BD Pharmingen) CD29، CD44 (clone 515; BD Pharmingen) CD73 (clone AD2; BD Pharmingen) clone CD133 (clone TMP4; eBioscience) Pharmingen CD10 (HI10a) CD146 (clone PIH12; BD Pharmingen) BD Pharmingen CD105 (clone 43A3; BioLegend) Pharmingen (FITC) و mouse anti human (clone 581; BD Pharmingen) کازوگه CD34 (clone 581; BD Pharmingen) CD45 (clone CD38 (clone HIT2; BD Pharmingen) HI30; BD Pharmingen) برای ۴۰ دقیقه در تاریکی انکوبه شدند. برای رنگ آمیزی غیرمستقیم با آنتی بادی غیرکنزوگه STRO1 پس از شست و شوی سلول‌ها با ۲٪ PBS-FBS سلول‌ها به مدت ۴۰ دقیقه با mouse anti human STRO1 (clone STRO-1; R&D Systems) پس از این مدت، دو بار با ۲٪ PBS-FBS شسته و با آنتی بادی ثانویه FITC-conjugated sheep anti mouse (Avicenna Research Institute) به مدت ۳۰ دقیقه انکوبه شدند. در مورد رنگ آمیزی سلول‌ها با آنتی بادی داخل سلولی OCT-4 پس از شست و شوی سلول‌ها با PBS، به مدت ۱۰ دقیقه در فرم آلدئید ۴٪ فیکس شدند. پس از این مدت، سلول‌ها با PBS شسته و به منظور افزایش نفوذ پذیری آنتی بادی در سلول رسوب سلولی در ساپونین ۱٪/۱ حل و ۷ دقیقه در دور ۲۰۰g سانتریفیوژ شد. سپس سلول‌ها به مدت ۴۰ دقیقه با آنتی بادی پلی کلونال غیرکنزوگه OCT-4 rabbit anti-human (Abcam) انکوبه شدند. پس از این مدت، سلول‌ها ۲ بار با ساپونین ۱٪/۱ در دور ۲۰۰g شسته و با آنتی بادی ثانویه FITC-conjugated goat anti rabbit Ig (Sigma) به مدت ۳۰ دقیقه انکوبه شدند. سپس سلول‌ها ۳ بار با PBS شسته و در محلول فرم آلدئید ۱٪ فیکس و تا زمان آنالیز در ۴°C قرار داده شدند. آنالیز نمونه‌ها با استفاده از دستگاه فلوسایتمتری Partec (Germany) نسبت به یک ایزوتایپ کنترل (clone MOPC-21; BD Pharmingen) انجام شد.

۳. تمایز سلول‌های بنیادی مشتق از خون قاعدگی به سمت سلول‌های استخوان و غضروف و چربی  
برای بررسی بیشتر خصوصیات سلول‌های بنیادی

فلورسنت (Olympus BX51) مشاهده شدند.

#### ۶. بررسی بیان ژن‌های اختصاصی قلبی در سلول‌های

##### تمایز داده‌شده با تکنیک Real-Time PCR

الگوی بیان مارکرهای قلبی از قبیل Connexin-43, ACTN2, TNNT2, TMP1 در سلول‌های تمایزی نسبت به سلول‌های غیرتمایزی با استفاده از qRT-PCR بررسی شدند. سلول‌های قلبی جدا شده از جنین‌های سقط شده (۸ تا ۱۲ هفته) به عنوان کنترل مثبت استفاده گردید. RNA کل از  $8 \pm 2 \times 10^5$  سلول تمایزی و غیرتمایزی با استفاده از کیت RNEasy (Qiagen, CA, USA) استخراج گردید. برای ساخت cDNA از RNA تیمار شده با ۱ مایکرولیتر DNase I (Fermentas Inc, MD, USA)، ۱ مایکرولیتر SuperScript™ II Reverse Transcriptase (Life Technologies, CA, USA)، ۴ مایکرولیتر ۲۰X First Strand buffer، ۲۰ پیکومول dNTP، ۲۰ پیکومول Mix N6 Random-Hexamer، ۲ مایکرولیتر Dithiothreitol (0.1M) و ۱ مایکرولیتر RiboLock™ RNase inhibitor (Fermentas Inc) در ترموسایکلر (Eppendorf, Germany) در  $25^{\circ}\text{C}$  برای ۱۰ دقیقه،  $42^{\circ}\text{C}$  برای ۵۰ دقیقه و  $70^{\circ}\text{C}$  برای ۱۵ دقیقه استفاده شد. سپس ۱ مایکرولیتر از cDNA (۱ مایکروگرم) با ۵ مایکرولیتر (x) SYBR™ Premix Ex Taq™ (Takara Bio Inc, Japan)، ۰/۲ مایکرولیتر از هر پرایمر ۱۰ پیکومولی (جدول ۱) با ۳/۶ مایکرولیتر آب مقطر دوبار تقطیر استریل مخلوط گردید و در نهایت واکنش qRT-PCR در دستگاه Rotor gene Q Real Time PCR (USA) انجام شد. در ضمن بیان ژن GAPDH به عنوان کنترل داخلی استفاده شد.

#### ۷. تحلیل آماری

تجزیه و تحلیل آماری نتایج بیان ژن در سلول‌های تمایزی نسبت به سلول‌های غیرتمایزی با تکنیک Real-Time PCR با استفاده از نرم‌افزار<sup>۲۴</sup> (۱۱ Ling Reg PCR Version) و REST-2009 انجام شد.

#### ۸. تمایز سلول‌های بنیادی مشتق از خون قاعدگی به سمت سلول‌های کاردیومیوسیت

برای تمایز سلول‌های بنیادی مشتق از خون قاعدگی به سمت سلول‌های کاردیومیوسیت از پاساژ دوم سلول‌های بنیادی بهره گرفته شد. بدین صورت که پس از انجام پاساژ سلولی، هنگامی که تراکم سلولی در پلیت‌های پوشانده شده با ۰/۱ درصد ژلاتین (از پوست خوک) (sigma) به ۷۰ تا ۸۰ درصد رسید، محیط کشت عادی از ظرف‌های کشت خارج شده و با محیط کشت تمایزی تعویض گردید. بدین منظور، سلول‌ها به مدت دو روز، در معرض ۱۰ مایکرومول ۵-آزاسایتیدین (sigma) و ۱۰ نانوگرم/میلی‌لیتر فاکتور رشد فیروبلاستی (sigma) قرار گرفتند. بعد از آن محیط سلول‌ها برداشته شد و سلول‌ها کاملاً با PBS شست‌و شو داده شدند تا اینکه هیچ گونه اثری از ۵-آزاسایتیدین در محیط باقی نماند. سپس سلول‌ها به مدت ۳ هفته در معرض محیط محتوی ۱۰ نانوگرم/میلی‌لیتر فاکتور رشد فیروبلاستی و ۵ درصد FBS کشت داده شدند و هر سه روز یک بار، محیط کشت سلول‌ها تعویض گردید.

#### ۵. رنگ‌آمیزی ایمونوفلورسنت

جهت آنالیز بیان پروتئین‌های اختصاصی کاردیومیوسیت از جمله Connexin-43 و TNNT2 سلول‌های کشت داده‌شده در محیط تمایزی در آخرین روز تمایز، با PBS استریل و گرم شست‌و شو شدند و بعد در محلول neutral-buffered formalin (NBF) به مدت ۱۵ دقیقه، در دمای اتاق تثبیت شدند. سلول‌های فیکس شده به مدت یک شب با آنتی‌بادی اولیه Polyclonal Anti-TNNT2 (۳۰۰:۱) و Polyclonal Anti-Connexin (۲۰۰:۱) در دمای ۴ درجه انکوبه شدند. سپس سلول‌ها ۳ بار با PBS شست‌و شو شدند و سپس به مدت ۴۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه با FITC-labeled sheep anti-mouse IgG (Avicenna Research Institute) انکوبه شدند. بعد از شست‌و شو با PBS سلول‌ها با 2-diamidino-4, 6 phenylindole (DAPI) (۱:۱۰۰) برای رنگ‌آمیزی هسته انکوبه گردیدند و سپس سلول‌ها با میکروسکوپ

جدول ۱. توالی پرایمرهای استفاده‌شده برای بررسی تمایز سلول‌های بنیادی مشتق از خون قاعدگی به سلول‌های شبیه به کاردیومیوسیت.

نام پرایمر	توالی پرایمر	طول قطعه حاصل (bp)	شماره ثبت پایی	دمای Annealing (C°)
TPM1	F 5'-GGCACCGAAGATGAACTGGACA-3' R 5'-GCGTCTGTTCAGAGAAGCTACG-3'	120	NM_000366	60
ACTN2	F 5'-GAGGGCAAGATGGTGTCCGGATA-3' R 5'-CTTCTCAGCCAGGTGTTCCAAG-3'	126	NM_001103	60
TNNT2	F 5'-AAGAGGCAGACTGAGCGGGAAA-3' R 5'-AGATGCTCTGCCACAGCTCCTT-3'	124	NM_000364	60
Connexin-43	F 5'-GGAGATGAGCAGTCTGCCTTTC-3' R 5'-TGAGCCAGGTACAAGAGTGTGG-3'	149	NM_000165	60
Connexin-40	F 5'-TAGGCAAGGTCTGGCTCACTGT-3' R 5'-GAAAGCCTGGTCTAGCAGACA-3'	149	NM_005266	60
GAPDH	F 5'-CTCTCTGCTCCTCCTGTTTCG-3' R 5'-ACGACCAAATCCGTTGACTC-3'	114	NM_00110	60

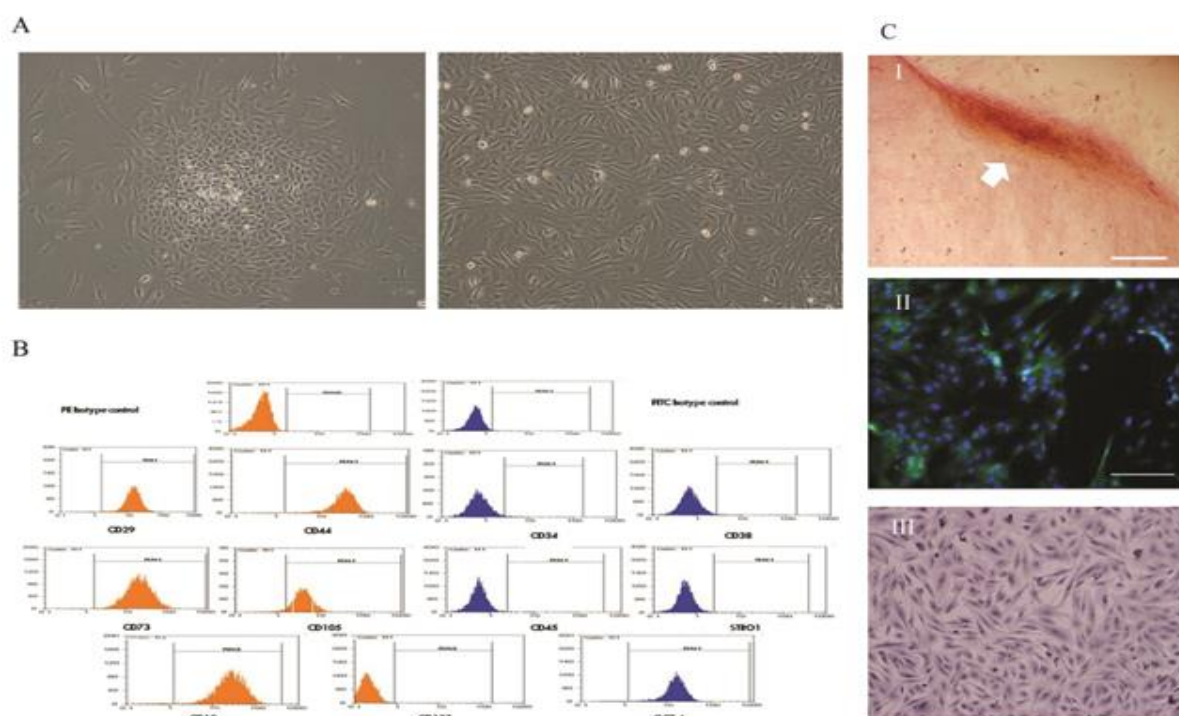
TPM1: Tropomyosin alpha-1 chain ,ACTN2: Actinin, alpha 2,TNNT2: Troponin T type 2, GAPDH: Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase.

### نتایج

می‌باشد. همچنین سلول‌های بنیادی خون قاعدگی قادر به بیان قابل توجه OCT-4 (۹۵درصد) می‌باشند. این در حالی است که مارکرهای ویژه سلول‌های هماتوپوئیتیک از جمله CD38، CD34، CD45، CD133 در این سلول‌ها بیان قابل توجهی نشان ندادند؛ همچنین سلول‌های بنیادی خون قاعدگی، قادر به بیان مارکر STRO1 نمی‌باشند (شکل ۱- B). این نتایج از یک سو نشان‌دهنده ویژگی منحصر به فرد سلول‌های بنیادی خون قاعدگی و از سوی دیگر مؤید کیفیت جداسازی سلول‌های بنیادی خون قاعدگی و حذف سلول‌های هماتوپوئیتیک در طی جداسازی سلول‌های استرومال از خون قاعدگی می‌باشد. تجمع ندول‌های کلسیمی که نشان از تمایز به سلول‌های استتوبلاستی می‌باشد در سلول‌های تمایز داده‌شده با استفاده از رنگ آمیزی آلیزارین رد مشاهده گردید. علاوه بر این سلول‌های تمایز یافته به غضروف کلاژن نوع II را بیان کردند. در حالی که رنگ آمیزی Oil red O سلول‌های تمایز یافته به چربی منفی بود (شکل ۱- C).

### ۱. ارزیابی خصوصیات سلول‌های بنیادی مشتق از خون قاعدگی کشت داده‌شده

به‌طور میانگین از هر ۵ سی‌سی خون قاعدگی ۸ الی ۱۰ میلیون سلول تک‌هسته‌ای جدا گردید که این تعداد در ۳ فلاسک ۷۵ تقسیم شد. حدود ۵ درصد از این تعداد را سلول‌های بنیادی تشکیل می‌دهند. سلول‌های بنیادی خون قاعدگی پس از یک شبانه‌روز، به کف فلاسک می‌چسبند. این سلول‌ها قادر به تشکیل کلنی بوده و پس از یک الی دو بار پاساژ، کشیده‌تر می‌شوند و ظاهری فیروبلاستی پیدا می‌کنند. بعد از حدود ده روز ۷۰ الی ۸۰ درصد فلاسک را پر می‌کنند. سرعت رشد سلول‌های بنیادی خون قاعدگی سریع می‌باشد؛ به طوری که پس از رسیدن به فاز لگاریتمی رشد، نیاز به دو بار پاساژ این سلول‌ها در هفته می‌باشد (شکل ۱- A). نتایج آنالیز فلوسایتومتری نشان می‌دهد که درصد بیان مارکرهای CD105، CD29، CD44، CD73، CD9 و CD10 در سلول‌های بنیادی خون قاعدگی به ترتیب ۹۵ درصد، ۹۹ درصد، ۹۹ درصد، ۹۹ درصد، ۹۸ درصد، ۹۷ درصد



شکل ۱. خصوصیات ظاهری سلول‌های بنیادی مشتق از خون قاعدگی.

A. مورفولوژی سلول‌های بنیادی مشتق از خون قاعدگی در کشت اولیه (سمت چپ) و پاساژ ۳ (سمت راست)، بزرگ‌نمایی:  $100\times$ . B. نمودار ایمونوفلوروسانس سلول‌های بنیادی مشتق از خون قاعدگی به وسیله فلوسایتومتری، C. سلول‌های بنیادی مشتق از خون قاعدگی تمایز یافته به استخوان (I) و غضروف (II) و چربی (III)

## ۲-۲. رنگ‌آمیزی ایمونوفلورسنت Connexin-43 و TNNT2

همان‌طور که در شکل (۳) نشان داده شده است، سلول‌های تمایز یافته در روز بیست‌ویکم قادر به بیان Connexin-43 و TNNT2 می‌باشند؛ این در حالی است که بیان این مارکرها در سلول‌های بنیادی خون قاعدگی قبل از تمایز (روز صفر) منفی بود.

## ۲-۳. بیان ژن‌های کاردیومیوسیت

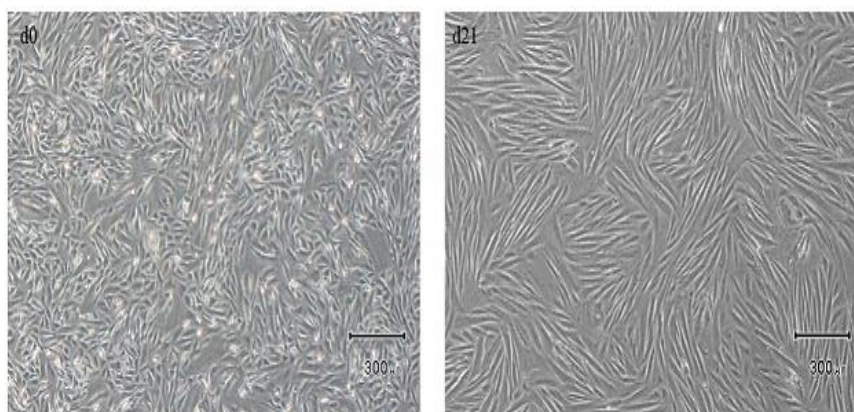
الگوی بیان Connexin-43، Connexin-40، و TMP1 به‌عنوان مارکرهای کاردیومیوسیتی و TNNT2 و ACTN2 به‌عنوان یک مارکر نهایی<sup>۲۵</sup> در سلول‌های تمایز یافته نسبت به سلول‌های تمایز نیافته با استفاده از Real-Time PCR بررسی شد. همان‌طور که در شکل ۴ نشان داده شده است، افزایش معنی‌داری در بیان ژن‌های Connexin-43، Connexin-40، TNNT2، و TMP1 ( $P=0.001$ ) در سلول‌های تمایزی نسبت به سلول‌های غیرتمایزی وجود دارد.

## ۲. ارزیابی سلول‌های بنیادی مشتق از خون قاعدگی

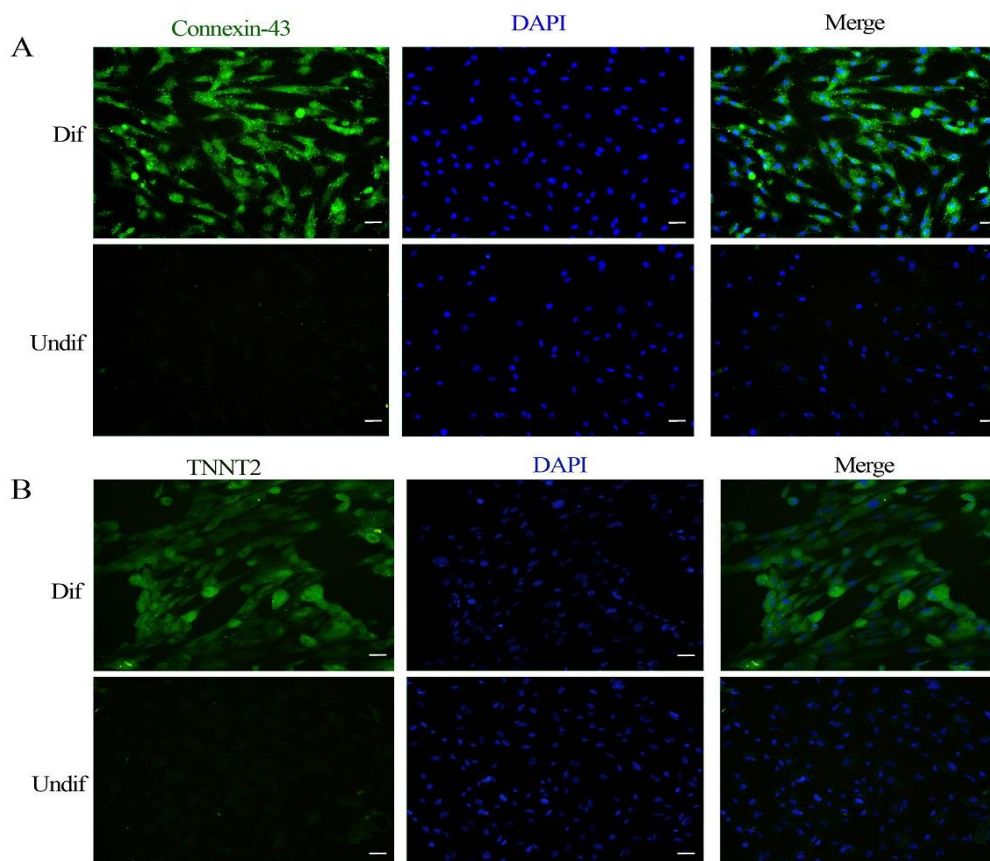
تمایز داده‌شده به سمت سلول‌های کاردیومیوسیت

### ۲-۱. بررسی مورفولوژیکی سلول‌های تمایز داده‌شده

مورفولوژی ظاهری سلول‌های کشت داده‌شده در محیط تمایزی در حین تمایز با میکروسکوپ فاز کتر است مشاهده شد. این سلول‌ها قبل از تمایز، شکلی شبیه فیروبلاست داشتند. در حین تمایز، بعد از اضافه کردن آزاسایتیدین تعداد کمی از سلول‌ها مردند و از کف فلاسک جدا شدند، اما سلول‌های باقی‌مانده کم‌کم شروع به تغییر شکل کردند؛ به طوری که یک هفته بعد از آغاز تمایز، به‌طور واضح سلول‌هایی دیده شد که شروع به کشیده و بلند شدن کردند. در هفته دوم تمایز، تعداد بیشتری از سلول‌ها حالت کشیده پیدا کردند و در هفته سوم تمایز مشاهده شد که سلول‌های کشیده‌شده که مورفولوژی Stick-like داشتند و شروع به برقراری ارتباط با سلول‌های مجاور خود کردند و همچنین یکظمی در ساختار آن‌ها ایجاد شده است (شکل ۲).

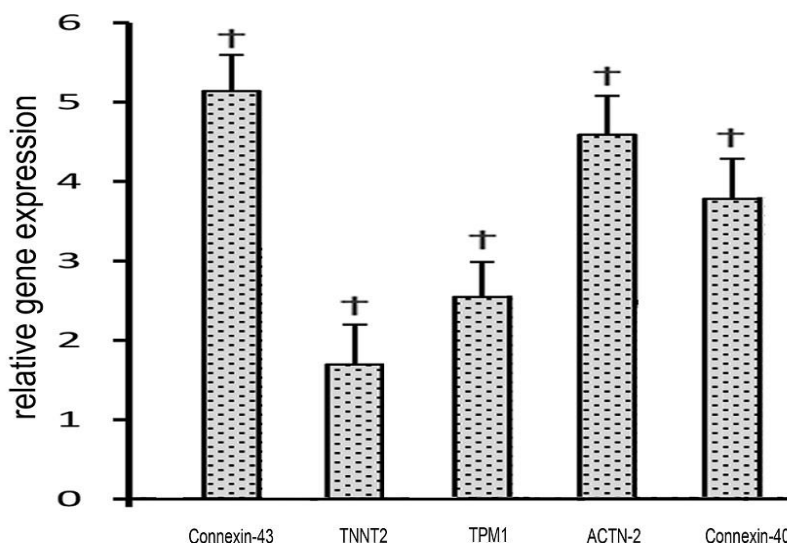


شکل ۲. تغییرات مورفولوژیکی سلول‌های بنیادی مشتق از خون قاعدگی به سلول‌های شبه‌کاردیومیوسیت در طول ۲۱ روز، با استفاده از میکروسکوپ معکوس. بزرگ‌نمایی: ۳۰۰X



شکل ۳. رنگ‌آمیزی ایمونوفلورسنت سلول‌های بنیادی مشتق از خون قاعدگی تمایز یافته به سمت کاردیومیوسیت. بیان پروتئین‌های Connexin-43 (A) و TNNT2 (B) در سلول‌های تمایزی با رنگ‌آمیزی ایمونوفلورسنت (رنگ سبز) بررسی گردید. هسته‌ها با DAPI (آبی) رنگ شدند. بزرگ‌نمایی: ۲۰ X





شکل ۴. نتایج Real Time PCR: داده‌های مربوط به سلول‌های تمایزی با نتایج مربوط به GAPDH متعادل شدند و سپس نسبت به سلول‌های غیرتمایزی محاسبه گردیدند. † تفاوت معنی‌دار  $P=0.001$  سلول‌های تمایزی در مقایسه با سلول‌های غیرتمایزی است.

### بحث و نتیجه‌گیری

اخیراً سلول‌های بنیادی مشتق‌شده از خون قاعدگی به‌عنوان یک جمعیت منحصربه‌فرد از سلول‌های بنیادی تشخیص داده شده‌اند و امیدهای فراوانی را برای سلول‌درمانی ایجاد کرده است (۲۶،۲۷). هرچند مطالعات فراوانی نیاز است تا این سلول‌ها را برای سلول‌درمانی و مهندسی بافت مناسب معرفی کنند. در این مطالعه، خصوصیات منحصربه‌فرد و توان تمایزی قلبی سلول‌های بنیادی مشتق از خون قاعدگی بررسی شده است. در مرحله اول، در کل خصوصیات مورفولوژیکی، تکثیر و ایمونوفنوتایپینگ سلول‌های بنیادی مشتق از خون قاعدگی را بررسی کردیم. ما مشاهده کردیم که بخش سلول‌های چسبنده خون قاعدگی یک مورفولوژی شبه‌مزانشیمی داشتند، اما سریع‌تر از سلول‌های بنیادی مشتق از مغز استخوان تکثیر می‌یافتند. بیان بالای مارکرهای سلول‌های بنیادی مزانشیمی CD105, CD44, CD73 همچنین Oct-4 به‌عنوان یک مارکر سلول بنیادی جنینی خصوصیت دوگانه سلول‌های بنیادی مشتق از خون قاعدگی را نشان می‌دهد. از طرف دیگر، عدم بیان مارکر سلول‌های

بنیادی مزانشیمی STRO-1 و مارکرهای سلول‌های بنیادی جنینی از قبیل NANOG و SSEA-4 سلول‌های بنیادی مشتق از خون قاعدگی انسان را از این دو نوع سلول بنیادی متمایز می‌کند. ارزیابی‌های اولیه ما حاکی از توانایی تمایز این سلول‌ها به رده‌های غضروف و استخوان است؛ با این حال این سلول‌ها توان تمایز به سمت سلول‌های چربی را نداشتند. بر اساس خصوصیات فنوتیپی، مورفولوژیکی و تکثیر سلول‌های بنیادی مشتق از خون قاعدگی، ما در نظر گرفتیم که این سلول‌ها را به سمت سلول‌های کاردیومیوسیت تمایز دهیم. تاکنون تأثیر فاکتورهای رشد و سیتوکین‌های مختلفی جهت تمایز کاردیومیوسیتی سلول‌های مزانشیمی مشتق از مغز استخوان مورد مطالعه قرار گرفته است، نظیر 5-azacytidin به‌تنهایی (۲۸،۲۹)، ترکیبی از 5-azacytidin با bFGF (۳۰)، ترکیبی از bFGF و BMP-2 و IGF (۳۱) و هم‌کشتی با کاردیومیوسیت‌ها (۳۲،۳۳). داده‌های به‌دست‌آمده از این مطالعات نشان می‌دهد که نوع و ترکیب و غلظت فاکتورهای رشد و سیتوکین‌ها و مدت زمان تمایز در تمایز سلول‌های مزانشیمی مشتق از مغز

علاوه بر آن Yong Hahn و همکارانش نیز در سال ۲۰۰۸ گزارش کردند که bFGF همراه با BMP-2 و IgF در تمایز کاردیومیوسیتی نقش قابل توجهی دارد. Vidarsson و همکارانش در سال ۲۰۱۰، فاکتورهای رشد مؤثر در تمایز قلبی را در سه گروه مهم قرار دادند که یک گروه از آن‌ها bFGFها بودند (۳۵). در این گروه bFGF نقش مهمی در تمایز و بقا و مهاجرت سلولی دارد. bFGF یک عضو از خانواده heparin-binding growth factors است که به رسپتورهای تیروزین کیناز متصل می‌شوند. در قلب نشان داده شده که بیان bFGF بعد از آسیب‌های قلبی از قبیل سکته قلبی افزایش می‌یابد؛ همچنین باید به این نکته توجه کرد که در طول embryogenesis، bFGF نقش مهمی را در حرکت سلول‌های مزودرمی به سمت کاردیومیوسیتی بازی می‌کند (۳۶-۳۸). در کل، نتایج ما نشان داد که سلول‌های بنیادی مشتق از خون قاعدگی پتانسیل خوبی جهت تمایز به سلول‌های کاردیومیوسیت دارند. به گونه‌ای که بیان پاره‌ای از مارکرهای اختصاصی قلبی در سلول‌های تمایز داده شده نسبت به سلول‌های غیرتمایزی افزایش می‌یابد؛ بنابراین با توجه به دسترسی آسان و غیرتهاجمی به نمونه خون قاعدگی و پتانسیل تکثیری بالای سلول‌های بنیادی مشتق از خون قاعدگی به نظر می‌رسد که این سلول‌ها منبع مناسبی جهت اهداف سلول‌درمانی بیماری‌های قلبی باشند. از سوی دیگر، بررسی مسیرهای سیگنالینگ که در تمایز سلول‌های بنیادی مشتق از خون قاعدگی نقش دارند به تبیین ماهیت این سلول‌ها کمک می‌کند. بدون شک با پیشرفت‌های آینده در مهندسی بافت و سلول‌درمانی می‌توان از این سلول‌ها در جهت منافع بیماران زیادی استفاده کرد.

استخوان به سلول‌های شبه کاردیومیوسیت تأثیرگذار است. با وجود مطالعات گسترده‌ای که بر روی تمایز سلول‌های مزانشیمی مشتق از مغز استخوان به سمت کاردیومیوسیت در شرایط *in vitro* وجود دارد، تاکنون مطالعات کمی در جهت تمایز کاردیومیوسیتی سلول‌های بنیادی مشتق از خون قاعدگی انسان انجام گرفته است. تلاش برای تمایز سلول‌های بنیادی مشتق از خون قاعدگی به سلول‌های کاردیومیوسیت اولین بار، توسط Hida و همکارانش در آوریل ۲۰۰۸ توسط Azacytidin همراه با هم‌کشتی با کاردیومیوسیت‌های جنینی موش و Patel و همکاران در فوریه ۲۰۰۸ توسط 5-azacytidin به همراه گلو تاماکس انجام گرفت. محققین ژاپنی در آوریل سال ۲۰۰۸ ضربان نبض دار و تشکیل تارهای عضلانی قلبی را در سلول‌های پیش‌ساز جدا شده از خون قاعدگی که همراه سلول‌های قلبی موش صحرائی کشت داده شده بودند گزارش کردند. آن‌ها نشان دادند که ۲۷ تا ۳۲ درصد سلول‌های قلبی تمایز یافته از منشأ سلول‌های خون قاعدگی پروتئین تروپونین I را بیان کردند و پیوند سلول‌های تمایز یافته به موش *nude* سبب ترمیم اختلال قلبی به وجود آمده و کاهش انفارکتوس قلبی شد (۲۳). در این مطالعه تأثیر دو فاکتور مهم درگیر در تمایز کاردیومیوسیتی، 5-Azacytidin و bFGF در ترکیب با درصد کمی از سرم در محیط کشت، بر روی تمایز سلول‌های بنیادی مشتق از خون قاعدگی بررسی گردید. نتایج ما نشان داد که azacytidin همراه با bFGF در طول سه هفته، تأثیر قابل توجهی بر روی بیان فاکتورهای اختصاصی سلول‌های کاردیومیوسیتی دارد. در تأیید این یافته‌ها، Wenrong و همکارانش در سال ۲۰۰۴ گزارش کردند که 5-azacytidin به همراه bFGF در طول دو هفته، باعث افزایش بیان beta-MHC, desmin, alpha-cardiac actin و cardiac troponin T در سطح پروتئین alpha-cardiac actin, beta-myosin heavy chain و desmin می‌شود؛ همچنین Singla و همکارانش در سال ۲۰۰۵، نشان دادند که bFGF نقش مهمی در تمایز hESCs به سمت سلول‌های کاردیومیوسیتی دارد (۳۴).

منابع

1. Pfeffer MA, Braunwald E. Ventricular remodeling after myocardial infarction. Experimental observations and clinical implications. *Circulation* 1990;81(4):1161-72
2. Li RK, Jia ZQ, Weisel RD, Mickle DA, Zhang J, Mohabeer MK, et al. Cardiomyocyte transplantation improves heart function. *The Annals of Thoracic Surgery* 1996;62(3):654-60
3. Eriksson H. Heart failure: a growing public health problem. *Journal of Internal Medicine* 1995;237(2):135-41.
4. Li RK, Mickle DA, Weisel RD, Mohabeer MK, Zhang J, Rao V, et al. Natural history of fetal rat cardiomyocytes transplanted into adult rat myocardial scar tissue. *Circulation* 1997;96(9):179-86
5. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999;284(5411):143-7.
6. Toma C, Pittenger MF, Cahill KS, Byrne BJ, Kessler PD. Human mesenchymal stem cells differentiate to a cardiomyocyte phenotype in the adult murine heart. *Circulation* 2002;105(1):93-8.
7. Edwards RG. Stem cells today: B1. Bone marrow stem cells. *Reproductive BioMedicine Online* 2004;9(5):541-83.
8. Tuan RS, Boland G, Tuli R. Adult mesenchymal stem cells and cell-based tissue engineering. *Arthritis Research & Therapy* 2003;5(1):32-45.
9. Meng X, Ichim TE, Zhong J, Rogers A, Yin Z, Jackson J, et al. Endometrial regenerative cells: a novel stem cell population. *Journal of Translational Medicine* 2007 15;5:57.
10. Musina RA, Belyavski AV, Tarusova OV, Solovyova EV, Sukhikh GT. Endometrial mesenchymal stem cells isolated from the menstrual blood. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine* 2008;145(4):539-43.
11. Masuda H, Matsuzaki Y, Hiratsu E, Ono M, Nagashima T, Kajitani T, et al. Stem cell-like properties of the endometrial side population: implication in endometrial regeneration. *Plos One* 2010;5(4):e10387
12. Patel AN, Park E, Kuzman M, Benetti F, Silva FJ, Allickson JG. Multipotent menstrual blood stromal stem cells: isolation, characterization, and differentiation. *Cell Transplant* 2008;17(3):303-11.
13. Allickson JG, Sanchez A, Yefimenko N, Borlongan CV, Sanberg PR. Recent Studies Assessing the Proliferative Capability of a Novel Adult Stem Cell Identified in Menstrual Blood. *Open Stem Cell J* 2011;3(2011):4-10.
14. Darzi S, Zarnani AH, Jeddi-Tehrani M, Entezami K, Mirzadegan E, Akhondi MM, et al. Osteogenic differentiation of stem cells derived from menstrual blood versus bone marrow in the presence of human platelet releasate. *Tissue Engineering Part A* 2012;18(15-16):1720-8.
15. Khanmohammadi M, Khanjani S, Bakhtyari MS, Zarnani AH, Edalatkhah H, Akhondi MM, et al. Proliferation and chondrogenic differentiation potential of menstrual blood- and bone marrow-derived stem cells in two-dimensional culture. *International Journal of Hematology* 2012;95(5):484-93.
16. Kazemnejad S, Akhondi MM, Soleimani M, Zarnani AH, Khanmohammadi M, Darzi S, et al. Characterization and chondrogenic differentiation of menstrual blood-derived stem cells on a nanofibrous scaffold. *The International journal of Artificial Organs* 2012;35(1):55-66.
17. Khanjani S, Khanmohammadi M, Zarnani AH, Talebi S, Edalatkhah H, Eghtesad S, et al. Efficient generation of functional hepatocyte-like cells from menstrual blood-derived stem cells. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine* 2013 Mar 18. [Epub ahead of print]
18. Nikoo S, Ebtekar M, Jeddi-Tehrani M, Shervin A, Bozorgmehr M, Kazemnejad S, et al. Effect of menstrual blood-derived stromal stem cells on proliferative capacity of peripheral blood mononuclear cells in allogeneic mixed lymphocyte reaction. *Journal of Obstetrics and Gynaecology Research* 2012;38(5):804-9.
19. Martin-Rendon E, Sweeney D, Lu F, Girdlestone J, Navarrete C, Watt SM. 5-Azacytidine-treated human mesenchymal stem/progenitor cells derived from umbilical cord, cord blood and bone marrow do not generate cardiomyocytes in vitro at high frequencies. *Vox Sanguinis* 2008;95(2):137-48.
20. Fukuda K. Reprogramming of bone marrow mesenchymal stem cells into cardiomyocytes. *Comptes Rendus Biologies* 2002;325(10):1027-38.
21. Behfar A, Zingman LV, Hodgson DM, Rauzier JM, Kane GC, Terzic A, et al. Stem cell differentiation requires a paracrine pathway in the heart. *The FASEB Journal* 2002;16(12):1558-66.
22. Xu C, Police S, Rao N, Carpenter MK. Characterization and enrichment of cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells. *Circulation Research* 2002 20;91(6):501-8.
23. Hida N, Nishiyama N, Miyoshi S, Kira S, Segawa K, Uyama T, Mori T, Miyado K, Ikegami Y, Cui C, Kiyono T, Kyo S, Shimizu T, Okano T, Sakamoto M, Ogawa S, Umezawa A. Novel cardiac precursor-like cells from human menstrual blood-derived mesenchymal cells. *Stem Cells* 2008;26(7):1695-704.
24. Ruijter JM, Ramakers C, Hoogaars WM, Karlen Y, Bakker O, van den Hoff MJ, Moorman AF. Amplification efficiency: linking baseline and bias in the analysis of quantitative PCR data. *Nucleic Acids Research* 2009;37(6):e45.

25. Efe JA, Hilcove S, Kim J, Zhou H, Ouyang K, Wang G, Chen J, Ding S. Conversion of mouse fibroblasts into cardiomyocytes using a direct reprogramming strategy. *Nature Cell Biology* 2011;13(3):215-22.
26. Zhang MJ, Liu B, Xia W, Sun ZY, Lu KH. Could cells from menstrual blood be a new source for cell-based therapies? *Medical Hypotheses* 2009;72(3):252-4.
27. Gargett CE. Uterine stem cells: what is the evidence? *Human Reproduction Update* 2007;13(1):87-101.
28. Makino S, Fukuda K, Miyoshi S, Konishi F, Kodama H, Pan J, Sano M, Takahashi T, Hori S, Abe H, Hata J, Umezawa A, Ogawa S. Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells in vitro. *The Journal of Clinical Investigation* 1999;103(5):697-705.
29. Zhang Y, Chu Y, Shen W, Dou Z. Effect of 5-azacytidine induction duration on differentiation of human first-trimester fetal mesenchymal stem cells towards cardiomyocyte-like cells. *Interactive CardioVascular and Thoracic Surgery* 2009;9(6):943-6.
30. Xu W, Zhang X, Qian H, Zhu W, Sun X, Hu J, Zhou H, Chen Y. Mesenchymal stem cells from adult human bone marrow differentiate into a cardiomyocyte phenotype in vitro. *Experimental biology and medicine* 2004;229(7):623-31
31. Hahn JY, Cho HJ, Kang HJ, Kim TS, Kim MH, Chung JH, Bae JW, Oh BH, Park YB, Kim HS. Pre-treatment of mesenchymal stem cells with a combination of growth factors enhances gap junction formation, cytoprotective effect on cardiomyocytes, and therapeutic efficacy for myocardial infarction. *American College of Cardiology Foundation* 2008;51(9):933-43.
32. Rangappa S, Entwistle JW, Wechsler AS, Kresh JY. Cardiomyocyte-mediated contact programs human mesenchymal stem cells to express cardiogenic phenotype. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery* 2003;126(1):124-32.
33. Wang T, Xu Z, Jiang W, Ma A. Cell-to-cell contact induces mesenchymal stem cell to differentiate into cardiomyocyte and smooth muscle cell. *International Journal of Cardiology* 2006;109(1):74-81.
34. Singla DK, Sobel BE. Enhancement by growth factors of cardiac myocyte differentiation from embryonic stem cells: a promising foundation for cardiac regeneration. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2005;335(3):637-42.
35. Vidarsson H, Hyllner J, Sartipy P. Differentiation of human embryonic stem cells to cardiomyocytes for in vitro and in vivo applications. *Stem Cell Reviews and Reports* 2010;6(1):108-20.
36. Szebenyi G, Fallon JF. Fibroblast growth factors as multifunctional signaling factors. *International Review of Cytology* 1999;185:45-106.
37. Detillieux KA, Sheikh F, Kardami E, Cattini PA. Biological activities of fibroblast growth factor-2 in the adult myocardium. *Cardiovascular Research* 2003;57(1):8-19.
38. Solloway MJ, Harvey RP. Molecular pathways in myocardial development: a stem cell perspective. *Cardiovascular Research* 2003;58(2):264-77.

## Evaluation of differentiation potential of menstrual blood-derived stem cells to cardiomyocytes in vitro

Maryam Rahimi<sup>1,2</sup>, Amir-Hassan Zarnani<sup>3,4</sup>, Homa Mohseni-Kouchesfehani<sup>2</sup>, Somaieh Kazemnejad<sup>5\*</sup>

1. Department of Biology, Faculty of Sciences, Malayer University, Malayer, Iran.
2. Department of Animal Biology, Faculty of Biological Sciences, Kharazmi University, Tehran, Iran.
3. Nanobiotechnology Research Center, Avicenna Research Institute, ACECR, Tehran, Iran.
4. Immunology Research Center, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
5. Reproductive Biotechnology Research Center, Avicenna Research Institute, ACECR, Tehran, Iran.

\*Corresponding author e-mail: kazemnejad\_s@yahoo.com

### Abstract

**Background and Objective:** In recent decades, stem cell therapy has been introduced as a novel therapeutic approach for patients suffering from cardiac disorders. Recently, identification of menstrual blood-derived stem cells (MenSCs) as a unique source of stem cell with some characteristics as well as ease of access, high proliferative ability and renewability has created enormous promise for cell therapy.

**Materials and Methods:** In this study, differentiation ability of MenSCs into cardiomyocytes has been investigated. After MenSCs immunophenotyping, their differentiation into cardiomyocyte was investigated in the presence of 5-azacytidine and basic-fibroblast growth factor. Then, expression of the putative myogenic cells at mRNA and protein levels was determined by immunofluorescent staining and real-time quantitative PCR.

**Results:** Based on flow cytometric analysis, the isolated MenSCs typically expressed mesenchymal stem cell markers like CD105, CD73, CD44 and CD166 in parallel to OCT-4 as an embryonic marker. The differentiated MenSCs expressed cardiomyocyte markers at mRNA/protein level. The myogenic cells differentiated from MenSCs were positive for Connexin-43 and troponin T2 (TNNT2) protein. The mRNAs of Connexin-43, Connexin-40, Alpha actinin, Tropomyosin1 and TNNT2 were highly expressed in the differentiated myogenic cells.

**Conclusion:** Based on our data, MenSCs are a unique cell population with differentiation ability into cells with characteristics commonly attributed to cardiomyocytes.

**Keywords:** Menstrual blood, Stem cell, Cardiomyocyte, Differentiation