مجله علوم پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی
دوره ۲۴، شماره ۱، بهار۹۳، صفحات ۱ تا ۷

Original Article

اثرعصاره قلبی نوزاد موش NMRI بر تمایزسلول‌های بنیادی بند ناف موش NMRI

کاظم پریور[۱]، مریم ممیز صفت[۲]، نسیم حیاتی رودباری[۳]، مریم بنانج[۴]

[۱] استاد، گروه زیست شناسی جانوری، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم تحقیقات تهران
[۲] کارشناس ارشد، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال
[۳] استادیار، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم تحقیقات تهران
[۴] استادیار، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال

چکیده

سابقه و هدف: *سلول‌های بنیادی مزانشیمی بند ناف، سلول‌های پرتوانی هستند که قابلیت تبدیل و تمایز به انواع مختلفی از سلول‌ها را دارند. هدف از انجام این تحقیق بررسی تاثیرات القایی عصاره قلبی نوزاد موش NMRI بر سلول‌های بنیادی مزانشیمی بند ناف جنین موش NMRI بود.*

روش بررسی: *در این مطالعه تجربی، ابتدا سلول‌های بنیادی از بند ناف جنین‌های ۱۸-۱۶ روزه جدا و کشت داده شدند. پلیت حاوی سلول‌های بنیادی در انکوباتور CO2 که در دمای ۳۶/۵ درجه سانتی‌گراد و رطوبت ۵ درصد تنظیم شده بود انکوبه شد و از ۷ تا ۱۰ روز پس از کشت به فاصله چهار روز در میان به پلیت‌ها ۴۰ لاندا عصاره قلب موش ۱۴ روزه اضافه شد. پس از ۲۱ روز از اضافه کردن اولین عصاره قلبی سلول‌های مزانشیمی شروع به تمایز به سمت سلولهای شبه قلبی کردند. به منظور بررسی میزان بیان مارکرهای خاص سلول‌های قلبی از روش ایمنوسیتوشیمی استفاده گردید. برای این منظور از آنتی بادی اولیه آلفا اسموس ماسل اکتین به عنوان مارکر سلول‌های قلبی استفاده شد.*

یافته‌ها: *تغییرات مورفولوژیکی و مطالعات ایمنوسیتوشیمی وجود پروتئین آلفا اسموس ماسل اکتین که نشان دهنده تمایز سلول‌های مزانشیمی به سلول‌های عضلانی شبه قلب است را نشان داد.*

نتیجه‌گیری: *سلول‌های مزانشیمی بنیادی بند ناف توانایی تمایز به سلول‌های شبه قلبی در حضور عصاره قلبی را دارند و این توانایی تحت تاثیر فاکتورهای رشد القایی موجود در عصاره مذکور مشاهده گردید.*

واژگان کلیدی: *بند ناف، سلول‌های بنیادی مزانشیمی، عصاره قلبی، تمایز، سلول‌های شبه قلبی.*

مقدمه

سلول‌های بنیادی، سلول‌های اولیه‌ای هستند که توانایی تبدیل و تمایز به انواع مختلف سلول‌ها را دارند و از آنها می‌توان در تولید سلولها و در نهایت بافت‌های مختلف بدن استفاده نمود (۱). این سلول‌ها می‌توانند به طور مستمر رشد کرده و مشابه خود را بسازند (۲). همچنین می‌توانند برای مدت زیادی در شرایط آزمایشگاهی پرورش یابند و توانایی تمایز خود را از دست ندهند و در محیط به وسیله ترکیبی از عوامل رشد و تمایز، به مراحل پیشرفته جنین‌زایی و انواع متنوع سلول‌های بالغ تمایز یابند (۳). امروزه سلول‌های بنیادی را می‌توان به سلول‌های تخصص یافته بافت‌های مختلف تمایز داد و از آنها در اعمال درمانی استفاده نمود (۴). یکی از انواع سلول‌های بنیادی سلول‌های بنیادی مزانشیمی یا MSCs هستند که دارای دو خاصیت مهم قدرت خود نوزایی و تمایز به سه لایه جنینی هستند و به عنوان منبع مناسبی از سلول‌ها و ژن‌ها برای سلول درمانی و ژن درمانی بسیاری از بیماری‌های

آدرس نویسنده مسئول: تهران، دانشگاه آزاد، واحد تهران شمال، دانشکده علوم زیستی، مریم ممیزصفت
(**email**: maryam_ms60@ yahoo.com)

تاریخ دریافت مقاله: ۹۱/۹/۱
تاریخ پذیرش مقاله: ۹۲/۲/۳۱

مادرزادی و کشنده استفاده می‌شوند (۵). سلول‌های بنیادی مزانشیمی از انواع سلول‌های بنیادی بالغ چند توان هستند و قابلیت تبدیل شدن به انواع سلول‌های مزودرمی شامل فیبروبلاست‌ها، کندروبلاست‌ها، استئوبلاست‌ها، میوسیت‌ها و بقیه‌ی عناصر بستره سلول را دارا هستند (۶). MSCs همچنین می‌توانند به انواع مختلفی از سلول‌های قلبی و عروقی اندوتلیالی تبدیل شوند و می‌توانند به راحتی از مغز استخوان جدا شده و به صورت گسترده کشت داده شوند. این خصوصیت MSCها، آنها را تبدیل به وسیله درمانی مهمی برای بیماری‌های قلبی- عروقی کرده است. ثابت شده که پیوند MSC باعث بهبود مهم در سکته قلبی، بزرگ و گشاد شدن عضله قلبی و التهاب حاد عضله قلبی می‌شود (۷).

هدف از انجام این تحقیق بررسی تاثیرات القایی عصاره قلبی نوزاد موش NMRI بر سلول‌های بنیادی مزانشیمی بند ناف جنین موش NMRI بود.

مواد و روشها

در این مطالعه تجربی، از موش سفید آزمایشگاهی نژاد NMRI به عنوان حیوان مورد آزمایش استفاده شد. موش‌های ماده و نر از انیستیتو پاستور تهران تهیه و به اتاق پرورش حیوانات انتقال داده شدند. ۲۰ سر موش ماده نژاد NMRI به طور جداگانه باموش نر هم نژاد خود در قفس قرار گرفتند و در هر قفس ۲ موش ماده و یک موش نر قرار داده شد روز مشاهده پلاک واژینال (پلاک سفید رنگ که در دهانه واژن موش ماده تشکیل شده و پلاک واژنی نام دارد و شاخص تشخیص حاملگی در موش‌های ماده می‌باشد) روز صفر حاملگی درنظر گرفته شد. در روزهای ۱۶ تا ۱۸ بارداری که بهترین زمان برای گرفتن بند ناف جنین است، موش جراحی شد. حفره شکمی کاملاً باز شد و شاخ‌های رحمی به وسیله پنس استریل از بدن مادر جدا گردید و به زیر هود استریل شده انتقال داده شد. در زیر هود، رحم به وسیله قیچی استریل شکافته شد. جنین‌ها که هر کدام به یک جفت متصل هستند و درون پرده آمنیون قرار دارند خارج و بند ناف از جنین‌ها جدا شد و پتری دیش حاوی بند نافها بعد از سوآپ با الکل ۷۰ درصد به زیر هود ورتیکال که کار اصلی کشت در زیر آن انجام می‌شود، منتقل شد. بند نافهای جدا شده در یک پتری دیش جدید حاوی DMEM استریل جمع گردید و به وسیله قیچی تا حد امکان به قطعات کوچکتر تقسیم شدند. سوسپانسیون حاوی قطعات ریز شده بند نافها و محیط کشت به وسیله سمپلر به اپندرف‌های استریل منتقل و به مدت ۵ دقیقه در دور PRM ۱۵۰۰ در درجه حرارت ۴ درجه سانتی گراد سانتریفیوژ شد. پس از انتقال دوباره اپندروف‌ها به زیر هود با استفاده از روش هضم آنزیمی قطعات بافتی ته‌نشین شده ریزتر شد وسلول‌های آن از یکدیگر جدا شدند. به سوسپانسیون تشکیل شده، ۴ml محیط کشت استریل حاوی سرم (FBS) ۱۰ درصد اضافه گردید. سپس عمل پیپتینگ کردن انجام شد و سوسپانسیون تشکیل شده دوباره در سانتریفیوژ با دور ۱۵۰۰RPM به مدت ۵ دقیقه قرار داده شد. پس از سانتریفیوژ مجدد محلول رویی دور ریخته شد و به رسوب سلولی تشکیل شده ۱ میلی‌لیتر از محیط کشت تازه حاوی ۱۰ درصد سرم (FBS) اضافه گردید و عمل پیپتینگ انجام شد تا سلول‌ها کاملاً یکنواخت در محلول رویی پخش شوند. از سوسپانسیون سلولی حاصله به هر پلیت کشت سلول که خاصیت چسبندگی دارند، حدود ۲ml اضافه گردید. پلیت‌های کشت در انکوباتوری که بر روی دمای ۳۶/۵ درجه سانتی‌گراد و رطوبت ۵ درصد تنظیم شده، قرار داده شدند.

تعویض محیط کشت سلول‌ها

هر ۲ روز یک بار محیط کشت سلول‌ها تعویض شد، به این صورت که محلول محیط کشت قبلی سلول‌ها زیر هود توسط سمپلر استریل کاملاً خارج شد. سلول‌ها توسط محلول شستشوی PBS کاملاً شستشو داده شدند. سپس محلول DMEM به علاوه FBS تازه به محیط کشت سلول‌ها اضافه گردید.

روش تهیه عصاره

ابتدا در اتاق تشریح، یک موش ۱۴ روزه جراحی و قلب از قفسه سینه خارج و در یک پلیت استریل حاوی محلول شستشوی PBS و ۳ قطره بتادین قرار گرفت و به زیر هود منتقل شد. زیر هود ابتدا قلب با محلول شستشوی PBS شستشو شد، سپس توسط یک پنس و اسکارپل قطعه قطعه شد و تا حد امکان رگ‌ها از قلب جدا گردید. قطعات قلب همراه با ۲ میلی‌لیتر DMEM در تیوب سانتریفیوژ شیشه‌ای استریل ریخته شد و توسط دستگاه هموژنایزر همگن و یکنواخت شد و سوسپانسیون حاصله به مدت ۲۰ دقیقه با دور ۱۵۰۰RPM سانتریفیوژ شد، سپس محلول رویی توسط سر سرنگ کشیده شد و از فیلتر سرسرنگی با قطر منافذ ۰/۴۵ میکرومتر عبور داده شد تا استریل گردد. عصاره حاصل تا زمان استفاده در فریزر ۲۰ - درجه سانتی گراد نگه‌داری شد.

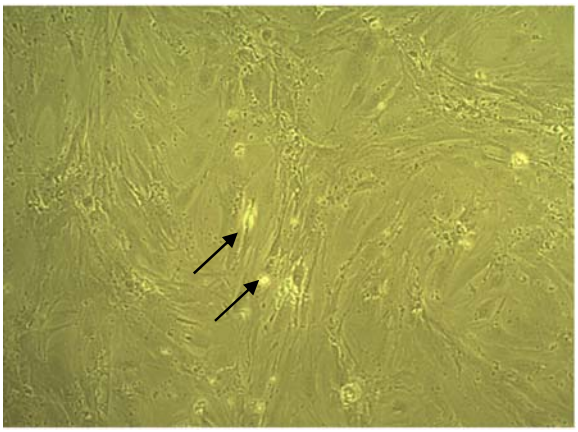
شیوه‌ی تأثیر عصاره قلب بر روی رده‌ی سلول‌های مزانشیمی به دست آمده

ابتدا محیط کشت قبلی کاملا توسط سمپلر استریل خارج گردید و سلول‌ها ۲ بار توسط محلول شستشوی PBS هر بار به مدت ۱ دقیقه شسته شدند. بعد به هر پلیت محیط کشت DMEM و ۱٪ FBS و ۴ دوز مختلف عصاره قلبی اضافه شد. ۴ روز در میان محیط کشت پلیت تعویض و دوباره عصاره قلبی اضافه گردید.

یافته‌ها

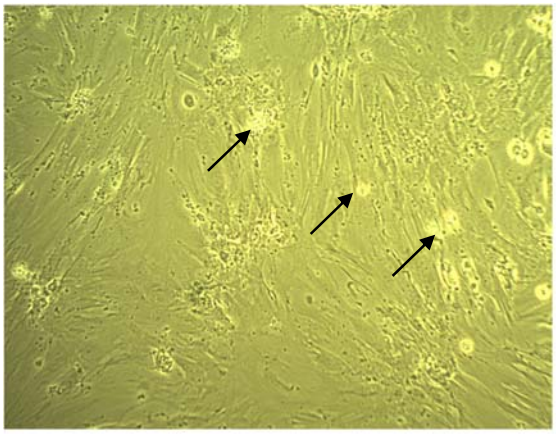
۱۰ روز پس کشت که سلول‌ها به تراکم لازم رسیدند، هر ۴ روز یک بار عصاره قلبی با غلظت‌های متفاوت به محیط کشت سلول‌ها اضافه شد و سلول‌های مورد نظر هر روز توسط میکروسکوپ فاز متضاد بررسی گردیدند که نتایج حاصله به شرح زیر است:

گروه اول: سلول‌های تیمار شده با عصاره قلبی به غلظت ۱۰ لاندا (شکل۱). در تیمار سلول‌ها با عصاره قلبی به غلظت ۱۰ لاندا فرایند جمع شدگی (Aggregate) که نشان دهند القا شدن سلول‌های بنیادی است، در تعداد کمی از سلول‌ها مشاهده شد.



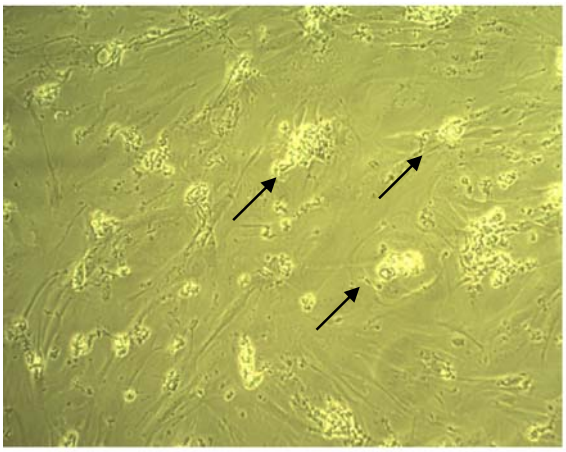
شکل۱- سلول‌های تیمار شده با غلظت ۱۰ لاندا (200 X). نوک پیکان نشان دهنده‌ی تشکیل Aggregate است.

گروه دوم: سلول‌های تیمار شده با عصاره قلبی به غلظت ۲۰ لاندا (شکل۲). با افزایش دوز عصاره قلبی فرایند جمع شدگی در تعداد بیشتری از سلول‌ها مشاهده گردید.



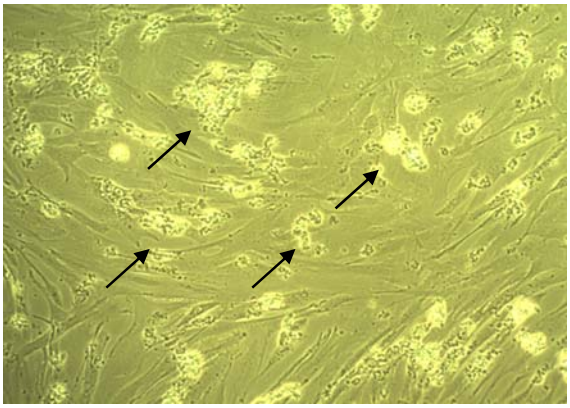
شکل ۲- سلول‌های تیمار شده به غلظت ۲۰ لاندا، (200 X).

گروه سوم: سلول‌های تیمار شده با عصاره قلبی به غلظت ۳۰ لاندا (شکل ۳). در این تیمار نسبت به ۲ دوز قبلی فرایند جمع شدگی در تعداد بیشتری از سلول‌ها مشاهده گردید.



شکل۳- سلول‌های تیمار شده به غلظت ۳۰ لاندا، (200 X).

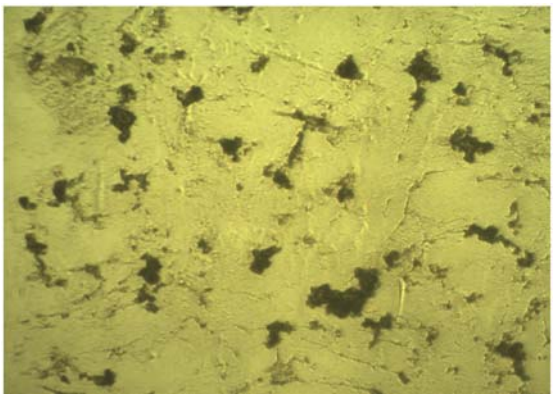
گروه چهارم: سلول‌های تیمار شده با عصاره قلبی به غلظت ۴۰ لاندا (شکل ۴).



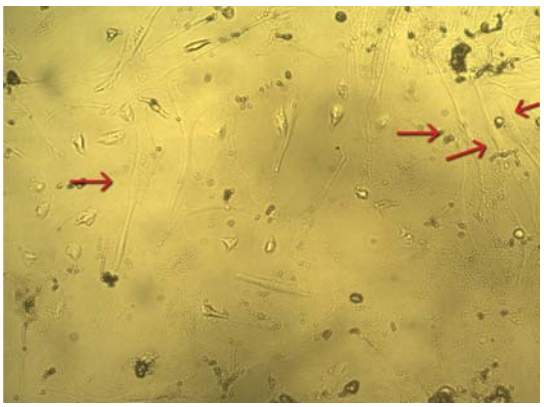
شکل ۴- سلول‌های تیمار شده به غلظت ۴۰ لاندا، (200 X).

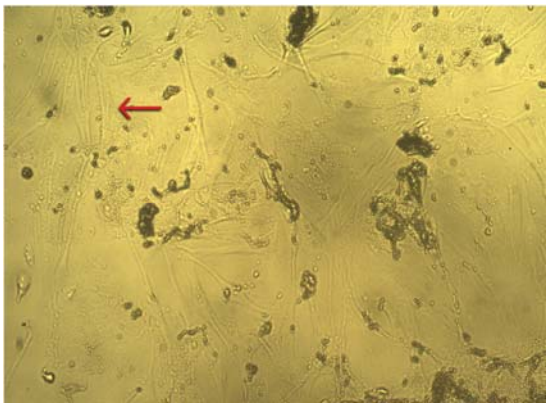
در تیمار سلول‌ها با عصاره قلبی به غلظت ۴۰ لاندا بیشترین فرایند جمع شدگی در سلول‌ها مشاهده گردید.

گروه پنجم: سلول‌های تیمار شده با عصاره قلبی به غلظت ۵۰ لاندا (شکل ۵). با تیمار سلول‌های بنیادی مزانشیمی با دوز ۵۰ لاندا عصاره قلبی، سلول‌ها به طور کامل دچار آلودگی و آپوپتوز گشتند.

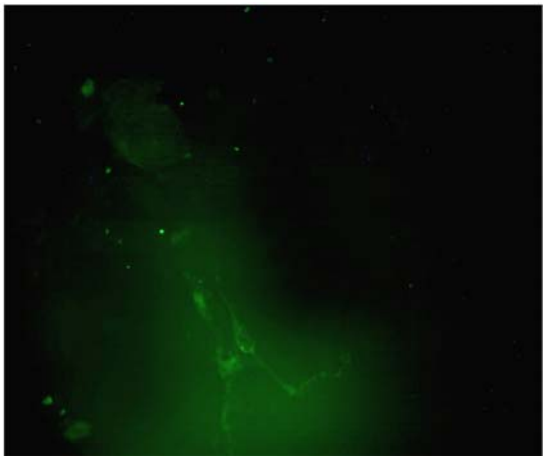


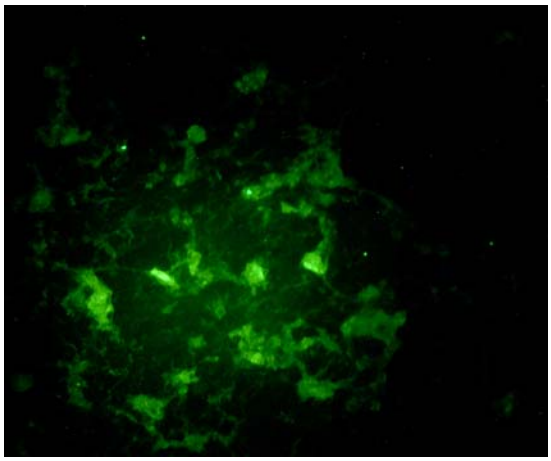
شکل ۵- سلولهای تیمار شده به غلظت ۵۰ لاندا، (X 200)





شکل۶- سلول های قلبی تمایز یافته از سلول های مزانشیمی با مورفولوژی تقریبی سلول های قلبی(X 200)



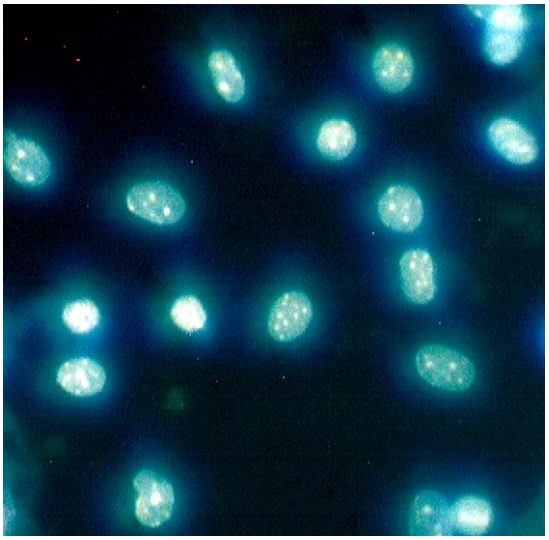


شکل۷- حضور پروتئین اختصاصی سلول قلبی در سلول شبه قلبی مشتق شده از سلول های بنیادی مزانشیمی القا شده: ایمونوفلوروسنت برای مارکر آلفا اسموس اکتینین – پس از ۷ بار تیمار با عصاره قلبی (X 400)

بررسی‌های فوق نشان داد که سلول‌های بنیادی مزانشیمی در تیمار با دوز ۴۰ لاندای عصاره قلبی بیشترین تمایز را نشان می‌دهند و فرایند جمع شدگی به خوبی در این دوز عصاره قلبی قابل مشاهده بود. دوز بیشتر عصاره باعث ایجاد آلودگی و از بین رفتن سلول‌ها شد. در تیمار با دوز ۴۰ لاندای عصاره قلبی از روز بیست ویکم تا روز سی‌ام تغییرات به تدریج در سطح سلول‌ها مشاهده گردید و در روز سی و چهارم، سلول‌ها از نظر مورفولوژیکی تغییر قابل توجهی به سمت سلولهای شبه قلبی داشتند (شکل ۶).

پلیت تیمار شده با عصاره قلبی به غلظت ۴۰ لاندا پس از ۷ بار تیمار با روش ایمنوسیتوشیمی و با استفاده از آنتی بادی اولیه آلفا اسموس ماسل اکتین به عنوان مارکر سلول های قلبی بررسی شد. مطالعات ایمنوسیتوشیمی وجود پروتیین آلفا

اسموس ماسل اکتین که نشان دهنده تمایز سلول‌های مزانشیمی به سلول‌های عضلانی شبه قلبی است را نشان داد (شکل۷).



شکل ۸- هسته‌های رنگ شده با رنگ DAPI، (X 400)

بحث

در حالی که بیش از یک دهه است که از سلول‌های بنیادی به شکل گسترده‌ای در به وجود آوردن موش‌های جهش یافته استفاده می‌شود، اما کاربرد آنها به عنوان مدل در زیست شناسی تکوینی محدود بوده و استفاده از آنان در سلول درمانی به سال‌ها زمان نیاز دارد. پیشرفت‌های اخیر در زمینه سلول‌های بنیادی موجب درک بهتر از چگونگی تمایز این سلول‌ها و همچنین گشودن افق‌های تازه‌ای در این زمینه گشته است (۸). در طب ترمیمی توصیف می‌شود که سلولهای بنیادی دارای خاصیت بالقوه درمانی در مداوای بافت‌های آسیب دیده می‌باشند. هر چند مراعات‌های اخلاقی موازی با محدودیت‌های عملی پذیرش اساس سلول‌های بنیادی را مسدود می‌کنند (۹). ایسکمی میو کاردیال (از بین رفتن سلول‌های عضلانی قلب) یکی از دلایل اصلی مرگ و میر در جهان است. مهندسی بافت به وسیله درمان با سلول بنیادی برای جایگذین کردن بافت آسیب دیده یا از بین رفته با جایگزین‌های بیولوژیکی همساز امید درمانی برای ترمیم قلب است. شواهد اخیر در نمونه‌های حیوانی نشان می‌دهد که سلول‌های جنینی و بالغ القا شده هر دو دارای قابلیت تبدیل شدن به انواع سلول‌های قلبی عروقی شامل سلول‌های عضلانی قلب هستند، هر چند به دلیل کمبود منابع سلول‌های عضلانی قلبی انسانی در دسترس استفاده‌های بالینی از این نوع درمان جایگزینی سلولی مختل می‌شود. با توجه به این موضوع، سلول‌های بنیادی که تبدیل به سلول‌های عضلانی قلب می‌شوند کاندیداهای بلقوه‌ای برای سلول‌های دهنده هستند (۱۰). ماکینو و همکارانش برای اولین بار در سال ۱۹۹۹ نشان دادند که سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان موش تحت تیمار با ۵-آزاسیتیدین توانایی تمایز به کاردیومیوسیت‌های ضربان‌دار را دارند (۱۱). زو و همکارانش گزارش نمودند که سلول‌های بنیادی مزانشیمی انسان که تحت القای فاکتورهای رشد قلب‌ساز بوده‌اند، مارکرهای تمایز میوژنیک از جمله دسمین، تروپونینT قلبی، آلفا کاردیاک اکتین را بیان نمودند (۱۲). هولویک و همکارانش در سال ۲۰۱۱با استفاده از اکسی توسین و۵-آزاسیتیدین توانستند سلول‌های بنیادی مزانشیمی بند ناف انسانی را به سلول‌های شبه قلبی تمایز دهند و رنگ آمیزی ایمنوسیتوشیمی بیان پروتئین‌های خاص قلبی از جمله کاردیاک اکتین وزنجیره سنگین میوزین و کاردیاک تروپونین را نشان داد (۱۳). مطالعات Orlic و همکارانش در سال ۲۰۰۱ نشان می‌دهد که پیش‌سازهای مغز استخوان بعد از تزریق به عضلهٔ ایسکمیک قلبی موش می‌توانند به سلول‌های قلبی تغییر یافته و جایگزین بافت مرده شوند (۱۴). بهاروند و همکاران در در سال ۲۰۰۵ نشان دادند که اجزای ماتریکس خارج سلولی مشتق از فیبروبلاست قلبی (کاردیوژل) در شرایط آزمایشگاهی از بلوغ اولیه سلول‌های قلبی مشتق از mESCs حمایت می‌کنند (۱۵). گزارش Menasche و همکارانش در سال ۲۰۰۲ برای اولین بار استفاده از سلول‌های میوبلاست در بهبود عملکرد قلب در انسان را شرح می‌دهد (۱۶). برای اولین بار در سال ۲۰۰۶ گو و همکاران موفق به تولید بافت قلبی از سلولهای (ES) موشی درمحیطin vitro شدند (۱۷).

در این مطالعه، نشان دادیم که سلول‌های بنیادی مزانشیمی به دست آمده ازبند ناف جنین موش NMRI تحت تأثیر القای عصاره قلبی به تنهایی به عنوان القاگر، قادرند مورفولوژی سلول‌های شبه قلبی پیدا کنند. سلول‌ها ظاهری برجسته و طویل به همراه هسته تخم مرغی شکل پیدا کرده که از مشخصات سلول‌های قلبی می‌باشد. بر خلاف تحقیقات پیشین، این مطالعه در غیاب عوامل القایی نظیر فاکتورهای رشد قلبی، Bfgf، اسفگنوزین-۱- فسفات و TGF-B انجام گردید. با توجه به روش جدید اعمال شده در این مطالعه، تمایز سلول‌های فیبروبلاستی بنیادی بند ناف موش NMRI در محدوده زمانی ۴۰ -۳۵ روز به سلول‌های قلبی انجام پذیرفت، اما مشخص گردید که روند تمایز سلول‌های بنیادی

مزانشیمی به سلول‌های شبه قلبی از دودمان مزودرمی با استفاده از تاثیر عصاره قلبی به تنهایی پروسه‌ای طولانی و زمان‌گیر می‌باشد و تمایز نهایی سلول‌های قلبی در حضور القاگرهای مناسب بافت قلب بهتر و در زمان کوتاه‌تری صورت می‌گیرد و عصاره قلب به تنهایی حاوی تمامی فاکتورهای رشد و القایی لازم برای تشکیل یک سلول قلبی بالغ ضربان‌دار نمی‌باشد. در این مطالعه، سلول‌های بنیادی مزانشیمی بند ناف با روش Friedenstien استخراج شدند (۱۸) و پس از ازدیاد سلول‌های فیبروبلاستی در پلیت‌های کشت سلولی، سلول‌های بنیادی مزانشیمی با عصاره قلبی در رقت‌های ۱۰λ، ۲۰λ،۳۰λ و ۴۰ λ در نهایت ۵۰λ به صورت ۴ روز در میان تیمار شدند. برای بررسی و اثبات نتایج از آزمون ایمونوسیتوشیمی به همراه رنگ آمیزی سلول‌ها با رنگ فلوروسنت FITC و همچنین از آنتی بادی اولیه آلفا اسموس ماسل اکتین استفاده گردید. پس از تیمار سلول‌ها با عصاره قلبی رقیق شده، سلول‌ها پروسه زمانی حدود ۳۵-۴۰ روز را طی کردند. تا روز بیست و یکم تأثیر عصاره نتیجه‌ای مشاهده نگردید، اما از روز بیست ویکم تا روز سی‌ام تغییرات به تدریج در سطح سلول‌ها مشاهده گردید و در روز سی و چهارم سلول‌ها از نظر مورفولوژیکی تغییر قابل توجهی به سمت سلول‌های قلبی داشتند و با تست ایمونوسیتوشیمی وجود پروتین آلفا اسموس ماسل که پروتیین اختصاصی سلولهای ماهیچه‌ای قلب است اثبات گردید که نشانه تمایز قطعی سلول‌های بنیادی مزانشیمی به سلول‌های شبه عضله قلبی بود. سلول‌های مزانشیمی تیمار شده با میزان دوز ۱۰λ عصاره قلبی کمترین تغییر شکل را از خود نشان دادند و با افزایش میزان دوز تاثیری عصاره قلبی به تدریج میزان سلول‌های مزانشیمی القا شده افزایش یافت تا در دوز ۴۰ لاندا به بالاترین میزان القا در سطح سلول‌های مزانشیمی رسیدیم. اما با تیمار سلول‌های بنیادی مزانشیمی با دوز ۵۰ لاندا سلول‌های پلیت‌های کشت سلولی به طور کامل دچار آلودگی و آپوپتوز گشتند. در این آزمایش تحقیقاتی یک پلیت کشت سلول حاوی سلول‌های بنیادی مزانشیمی به عنوان نمونه کنترل در نظر گرفته شد و این پلیت تحت تیمار عصاره قلبی قرار نگرفت، در نتیجه پس از رنگ آمیزی ایمونوسیتوشیمی هیچ نوع رنگی در این پلیت مشاهده نگردید که نشان از عدم سنتز پروتین آلفا اسموس ماسل و عدم تمایز سلولهای بنیادی مزانشیمی بود.

REFERENCES

1. Maleki M, Parivar K, Nabiyouni M, Yaghmai P, Naji M. Isolation of mouse umbilical cord mesenchymal stem cells and its differentiation to lens fiber cells. Research and scientific Journal, Ardabil University of Medical Sciences 2009; 9: 1-6. [In Persian]
2. Hayati RN, Parivar K, Kouchesfahani MH, Yaghmaei P. The effect of adult mouse lung extracts growth factors in differentiation of umbilical cord stem cells into blood cells in vitro condition. Medical Sciences Journal of Islamic Azad University, Tehran Medical Branch 2009; 19: 11-18. [In Persian]
3. Da Rosa Paz AH, Ayala Lugo A, Terraciano PB, Meurer L, Passos EP, Cirne Lima EO. In vitro differentiation of embryonic stem cells into cardiac- like and neuronal- like cells. Agricultural Sciences 2008; 28: 96-100.
4. Caspi O, Huber I, Kehat I; Habib M, Arbel G, Gepstein A, et al. Transplantation of human embryonic stem cell-derived Cardiomyocytes improves myocardia performance in infracted rat heart. J Am Coll Cardiol 2007; 50:1884-93
5. Nadri S, Soleimani M, Kiani J, Atashi A, Izadpanah R. Multipotent mesenchymal stem cells frome adult human eye conjunctive stromal cells. Differentiation 2007; 76: 223–31.
6. Brignier AC, Gewirtz AM. Embryonic and adult stem cell therapy. J Allergy Clin Immunol 2010; 125: S336-44.
7. Ohnishi S, Sumiyoshi H, Kitamura S. Nagaya N. Mesenchymal stem cells attenuate cardiac fibroblast proliferation and collagen synthesis through paracrine actions. FEBS let 2007; 581: 3961–66.
8. Keller G. Embryonic stem cells differentiation: emergence of a new era in biology and medicine, Genes Dev 2005; 19: 1129-55.
9. Nelson TJ, Martinez-Fernandez A, Yamada S, Perez-Terzic C, Ikeda Y, Terzic A. Repair of acute myocardial infarction by human stemness factors induced pluripotent stem cells. Circulation 2009; 120: 408–16.
10. Ya J, Markman MW, Wagenaar GT, Blommaart PJ, Moorman AF, Lamers WH. Expression of the smooth-muscle proteins a-smooth-muscle actin and calponin, and of the intermediate filament protein desmin are parameters of cardiomyocyte maturation in the prenatal rat heart. Anat Rec 1997; 249: 495-505.
11. Makino S, Fukuda K, Miyoshi S, Konishi F, Kodama H, Pan J, et al. Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal in vitro.J. Clin Invest 1999; 103:697-705.

12. Xu W, Zhang X, Qian H, Zhu W, Sun X, Hu J, et al. Mesenchymal stem cells from adult human bone marrow differentiate into a cardiomyocyte phenotype in vitro. Exp Boil Med 2004; 229: 623-31.

13. Hollweck T, Hartmann I, Eblenkamp M, Wintermantel E, Reichart B, Uberfuhr P, et al. Cardiac differentiation of human Wharton`s Jelly stem cells– experimental comparison of protocols. The Open Tissue Engineering and Regenerative Medicine Journal 2011; 4: 95-102.

14. Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Jakoniuk I, Anderson SM, Li B, et al. Bone marrow cells regrenerate infarted myocardium. J Nature 2001; 410: 701-705.

15. Baharvand H, ed. Department of stem cells. Tehran: Royan Institute; 2010. P.73. [In Persian]

16. Menasche P. Myoblast transplantation: feasibility, safety and efficacy. Ann Med 2002; 34: 314-15.

17. Guo XM, Zhao YS, Chang HX, Wang CY, Ling-Ling E, Zhang XA, et al. Creation of engineered cardiac tissue in vitro from mouse embryonic stem cells. Circulation 2006; 113: 2229-37.

18. Friedenstein AJ, Piatetzky-Shapiro II, Petrakova KV. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. J Embryol Exp Morph 1966; 16: 381-390.