**مقاله مروری**
**مجله دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان**
**دوره ۱۵، تیر ۱۳۹۵، ۳۷۶-۳۵۵**

# ارزیابی روش‌های تولید سلول‌های بنیادی پرتوان ـ مروری کوتاه

**محسن شیخ حسن[۱]، مهدیه غیاثی[۲]**

**دریافت مقاله: ۹۴/۱۲/۱۲ ارسال مقاله به نویسنده جهت اصلاح: ۹۵/۱/۲۳ دریافت اصلاحیه از نویسنده: ۹۵/۳/۱ پذیرش مقاله: ۹۵/۳/٤**

**چکیده**

امروزه سلول‌درمانی یکی از استراتژی‌های مهم و امیدوارکننده در زمینه درمان بیماری‌ها به شمار می‌رود. قابلیت‌های منحصر به فرد سلول‌های بنیادی باعث شده از آنها به عنوان یک منبع ارزشمند در تحقیقات علوم پایه و پزشکی، در هر دو زمینه پژوهش و درمان، استفاده شود. در حالی که مشکلات اخلاقی مربوط به استفاده از سلول‌های بنیادی، کاربرد این سلول‌ها را محدود کرده است، یکی از دغدغه‌های مهم دانشمندان برای توسعه و استفاده بیشتر از این علم، یافتن یک جایگزین مناسب جهت تولید این سلول‌ها می‌باشد. ایجاد سلول‌های بنیادی پرتوان القائی (IPSCs) یکی از مهمترین روش‌ها در نیل به این هدف محسوب می‌شود. در این رابطه، روش‌های مختلفی که توانایی تغییر پروفایل‌های بیان ژن و پروتئین‌ها را دارند-که نتیجه آن تغییر مورفولوژی و عملکرد سلول‌ها در جهت برگشت به حالت نامتمایز و ایجاد سلول‌های بنیادی است- در حال توسعه می‌باشند. این روش‌ها شامل انتقال هسته، استفاده از عصاره سلولی و مولکول‌های مصنوعی، بیان اجباری ژن‌های مشخص و تغییرات سطوح سیتوپلاسمی می‌باشد. در این مقاله مروری سعی شده است که روش‌های تولید سلول‌های بنیادی پرتوان القائی مورد بررسی قرار گیرد.

جستجوی مقالات از طریق ترکیبی از کلمات کلیدی زیر انجام شد: سلول‌های بنیادی پرتوان القائی، تکنیک‌های تمایززدایی، روش های تولید سلول‌های بنیادی پرتوان القائی. مقالات موجود در بررسی ما، دوره زمانی بین سال‌های ۲۰۰۲ و ۲۰۱۵ را پوشش می‌دهد. در پایان روند بررسی، ۶۸ مقاله در نسخه نهایی ما مورد استفاده قرار گرفتند. در مطالعه حاضر، ما به بررسی روش‌های مختلف تولید سلول‌های بنیادی پرتوان القائی پرداختیم.

**واژه‌های کلیدی:** سلول‌های بنیادی پرتوان القائی، تکنیک‌های تمایززدایی، روش‌های تولید سلول‌های بنیادی پرتوان القائی

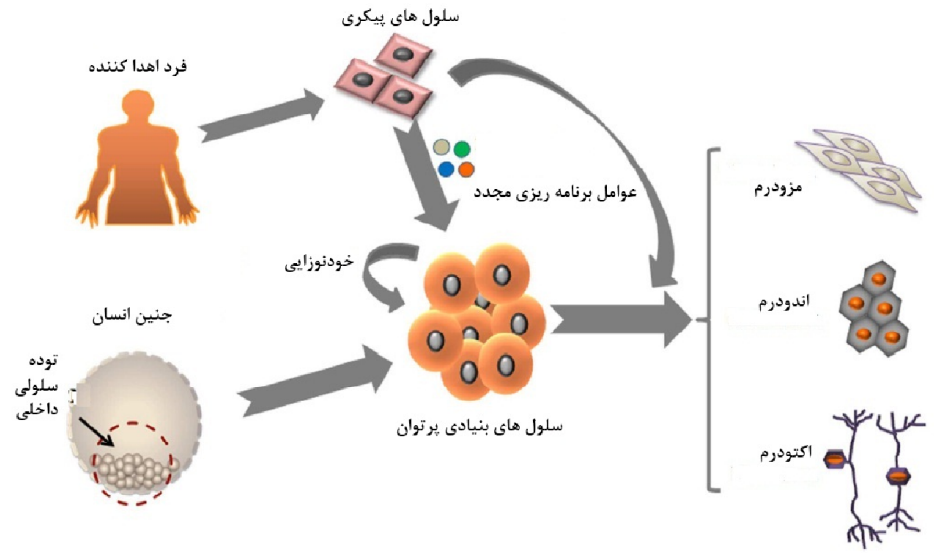
۱- کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی، آزمایشگاه سلول‌های بنیادی، جهاد دانشگاهی استان قم، قم، ایران
۲- کارشناسی ارشد زیست شناسی سلولی مولکولی، آزمایشگاه سلول‌های بنیادی، جهاد دانشگاهی استان قم، قم، ایران
تلفن: ۳۲۷۰۰۱۵۵-۰۲۵، دورنگار: ۳۲۷۰۰۱۵۴-۰۲۵، پست الکترونیکی: Mahdieh.ghiasi@yahoo.com

[ Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2024-03-19 ]

[ DOR: 20.1001.1.17353165.1395.15.4.7.8 ]

## مقدمه

سلول‌های بنیادی قادر به ایجاد هر نوع سلول در بدن هستند. آنها می‌توانند تحت تأثیر عوامل رشد مختلف در محیط کشت به سلول‌هایی با عملکردهای اختصاصی مانند سلول‌های ماهیچه قلب یا سلول‌های تولیدکننده انسولین، پانکراس و غیره تبدیل شوند. به این قابلیت، پرتوانی اطلاق می‌شود. سلول‌های بنیادی پرتوان علاوه بر توانایی تکوین به دو لایه جفتی، قادرند به سه لایه زاینده (اندودرم، مزودرم و اکتودرم) نیز تکوین یابند [۱]. بر اساس این حقیقت که در پستانداران عالی دستیابی به قابلیت پرتوانی مشکل است [۲]، جهت حل این مشکل و جایگزینی آن، تمایزیابی به سمت پرتوانی و چندتوانی در حال مطالعه می‌باشد. به طوری که قسمت عمده تلاش‌های علمی جهت نائل شدن به این هدف تمرکز یافته‌اند. سلول‌های بنیادی چندتوان آن‌هایی هستند که قادرند به رده‌های چندگانه اما محدود تمایز پیدا کنند. سلول‌های بنیادی پرتوان را می‌توان به عنوان یک حالت ژنومی در نظر گرفت که قادرند به سلول‌های سه لایه زایای جنینی تبدیل شوند (شکل ۱) [۳-۱].




**شکل ۱- منابع و خواص سلول های بنیادی پرتوان انسانی** [۳]

این سلول‌ها مسئول حفظ هومئوستازی بافتی هستند، به طوری که سلول‌های آسیب‌دیده و یا پیر را با سلول‌های جدید جایگزین می‌کنند [۴]. در طی سال‌های اخیر، سلول‌های بنیادی پرتوان جنینی از توده سلولی داخلی جنین انسان مشتق شده‌اند [۲]؛ با این حال، استفاده از این روش در اهداف تحقیقاتی محدود بوده و به لحاظ اجتماعی و اخلاقی چندان پذیرفته‌شده نیست. به همین دلیل، ضرورت داشتن منابع متفاوتی از سلول‌های بنیادی که بتوان از آنها در مطالعات تشخیصی یا درمانی استفاده کرد، یک زمینه مطالعاتی وسیع و جدیدی را ایجاد می‌کند. سلول‌های بنیادی پرتوان القائی (که معمولاً به صورت مخفف IPSCs شناخته می‌شوند) یک نوع از



[ Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2024-03-19 ]
[ DOR: 20.1001.1.17353165.1395.15.4.7.8 ]

سلول‌های بنیادی پرتوان هستند که می‌توانند به صورت مستقیم از سلول‌های بنیادی بالغ و تخصصی تولید گردند. این سلول‌ها، اولین بار توسط Yamanaka و همکارانش (۲۰۰۶) تولید شدند و به دلیل این که این سلول‌ها از سلول‌های تخصصی خود فرد تولید می‌شوند، مشکلات حاصل از پاسخ ایمونولوژیک را به همراه ندارند. در مقاله حاضر سعی شده است که به ارزیابی روش‌های تولید سلول‌های پرتوان القائی پرداخته شود.

## مواد و روش‌ها

در این مطالعه مروری، ترکیبات مختلفی از واژگان کلیدی شامل سلول‌های بنیادی پرتوان القائی، تکنیک‌های تمایززدایی در پایگاه‌های نشریات علمی PubMed، MEDLINE، Google Scholar، Medscape و پایگاه داده EMBASE به زبان انگلیسی مورد جستجو قرار گرفتند. بازه زمانی مقالات از سال ۲۰۰۲ تا ۲۰۱۵ لحاظ گردید. دو نویسنده به طور جداگانه به بررسی عناوین و خلاصه‌های مقالات شناسایی شده جهت ارزیابی تناسب آن‌ها با زمینه تحقیقاتی مورد نظر پرداختند. به منظور اطمینان از مرتبط بودن منابع با موضوع، تمامی منابع مورد بررسی قرار گرفتند.

همچنین مقالات تکراری نیز از مقالات انتخاب‌شده حذف شدند. معیار خروج از مطالعه، مقالاتی بودند که در آن‌ها به ارزیابی روش‌های تولید سلول‌های بنیادی پرتوان پرداخته نشده بود. سپس، مطالعات انتخاب شده بر اساس روش‌های تمایززدایی مورد استفاده، طبقه‌بندی شدند.

## نتایج

در پایان مراحل جستجوی مقالات، از مجموع ۹۵ مقاله به‌دست‌آمده از پایگاه‌های نشریات علمی و پایگاه داده، ۶۸ مقاله مناسب جهت نگارش این مقاله مروری انتخاب (نمودار ۱) و این مقالات بر اساس محتوای موضوعی طبقه‌بندی شدند. در مقاله مروری حاضر، نتایج حاصل از مطالعه ۶۸ مقاله انتخاب شده در قالب مطالب زیر ارائه شده است.

### ۱-۱ القاء پرتوانی در سلول‌های تمایزیافته

این موضوع به معنی عقب‌گرد در حوزه تکوین به منظور کسب سلول‌های بنیادی از سلول‌هایی است که به صورت کامل یا جزئی تمایز یافته‌اند. در این زمینه نتایج دلگرم‌کننده‌ای به دست آمده است. تاکنون، سلول‌های بنیادی پرتوان القائی (IPSCs) از سلول‌های پیکری انسان و موش مشتق شده‌اند.

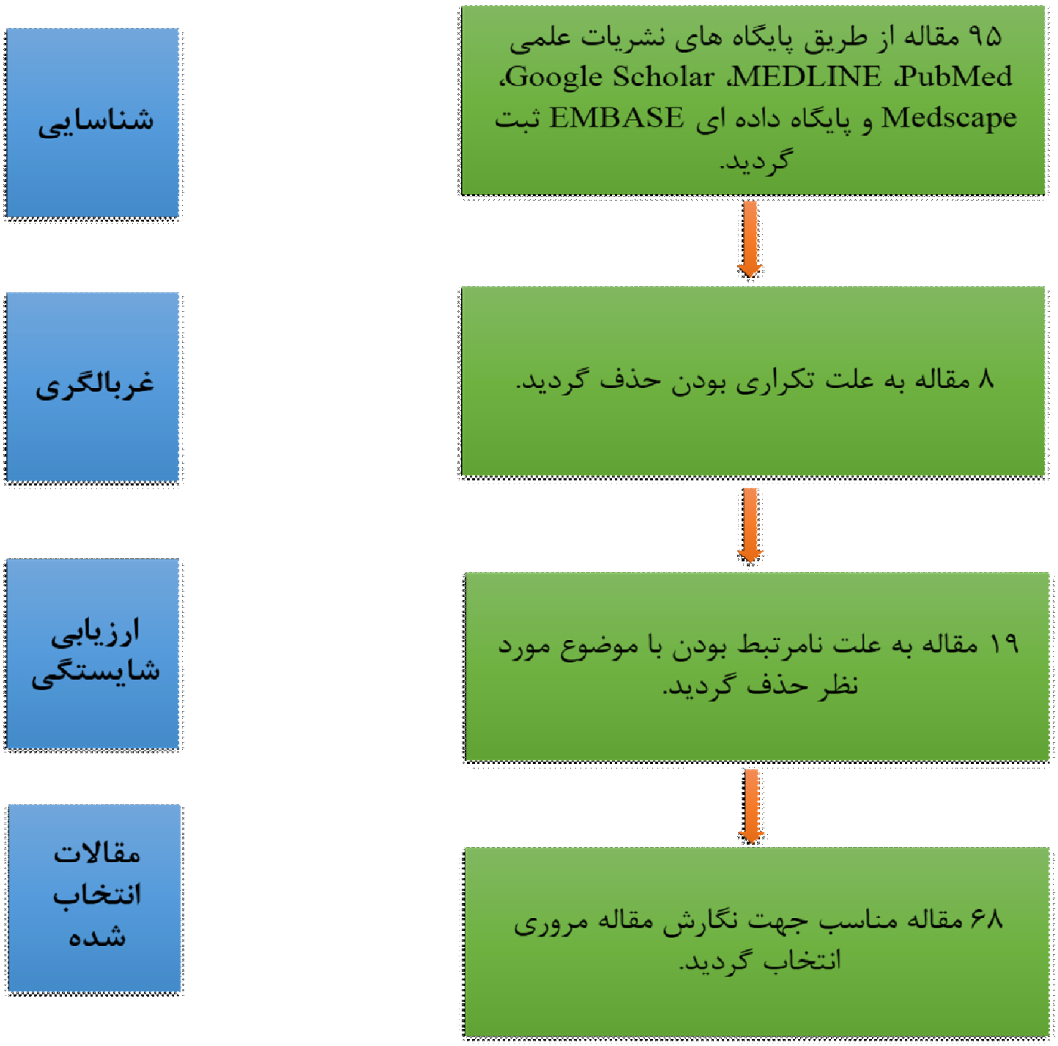
اگر چه این سلول‌ها به خوبی در شرایط آزمایشگاهی تکوین می‌یابند، با این حال آزمایش‌هایی که در شرایط حیاتی صورت می‌پذیرند، همیشه نتایج مورد قبول را ارائه نمی‌دهند؛ به طوری که سلول‌های IPSCs را می‌توان به اندام‌های هدف مختلف پیوند زد، اما قابلیت تکثیر و تمایز را در برخی از قسمت‌های اندام (و نه همه قسمت‌ها) ایجاد می‌کنند [۱]. علاوه بر این، بر اساس توانایی آنها در ایجاد هر کدام از سلول‌های لایه زاینده، پیوند این سلول‌ها می‌تواند با میزان بالای ایجاد تومور در اندام‌ها همراه باشد. یک تکوین موفق که بر اساس فرایند کارآمد و مطمئن تمایززدایی سلول اتفاق می‌افتد، راهی را ایجاد می‌کند که می‌تواند جایگزین پیوندهای ناموفق شده و امید به زندگی



[ Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2024-03-19 ]

[ DOR: 20.1001.1.17353165.1395.15.4.7.8 ]

را برای هزاران نفر در سراسر جهان افزایش دهد. هدف این مقاله بازنگری کلی موضوع تولید سلول‌های بنیادی پرتوان القائی است که مهم‌ترین و امیدبخش‌ترین روش‌های تمایززدایی مورد استفاده در گروه‌های مختلف تحقیقی را در سراسر جهان تشکیل می‌دهد. امروزه در حیوانات نیز از سلول‌های تمایزیافته مختلف برای تولید سلول‌های بنیادی پرتوان القائی استفاده شده است که به صورت خلاصه به همراه کلیات روش‌های تمایززدایی مورد استفاده در جدول ۱ آمده است.




***نمودار ۱-مراحل مختلف ارزیابی و انتخاب مقالات مناسب جهت نگارش مقاله مروری حاضر***



[ Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2024-03-19 ]
[ DOR: 20.1001.1.17353165.1395.15.4.7.8 ]

### ۱-۲ روش‌های القای پرتوانی

نزدیک به ۱۰ سال است که پروتکل‌های پژوهشی مرتبط با این موضوع به صورت گسترده‌ای در حال پیشرفت هستند، در حالی که Evans و Kauffman اولین مطالعات را در مورد تولید سلول‌های بنیادی جنینی حدود ۳۰ سال پیش آغاز کردند [۴]. رده‌های متفاوت سلول انسان، موش صحرایی و موش جهت آنالیز ژن‌های دخیل در فرایند تمایز و حفظ حالت پرتوانی مورد استفاده قرار گرفته‌اند. اطلاعات اندکی در رابطه با مکانیسم‌های برنامه‌ریزی مجدد (Reprogramming) یا تمایززدایی (Dedifferentiation) وجود دارد، ولی به صورت قاطع بازآرایی کروماتین یک گام کلیدی در این فرایند است. پس از تکمیل شدن فرایند تمایززدایی، مسیرهای سیگنال‌دهی LIF، Wnt و BMP، که گروهی از مسیرهای انتقال سیگنال (signal transduction) پروتئینی هستند که سیگنال‌ها را از طریق گیرنده‌های سطحی سلول از بیرون سلول به داخل آن هدایت می‌کنند، برای حفظ سلول‌های بنیادی در فرایند خودنوزایی درگیر می‌شوند [۵-۷].

فرایند تمایززدایی می‌تواند در مراحل مختلف ارزیابی شود. طی این فرایند، بیان ژن‌های سلول مورد نظر معکوس گردیده و در نتیجه، از یک سو فعالیت ژن‌های مرتبط با تکوین سلول خاموش شده و از سوی دیگر ژن‌های مربوط به تمایززدایی فعال می‌شوند. در سطح پروتئین نیز تغییراتی در بیان به وجود می‌آید که از جمله این تغییرات، بیان بیشتر پروتئین‌های سلول‌های پیش‌ساز و بیان کمتر پروتئین‌های مربوط به سلول‌های تمایزیافته می‌باشد. در این فرایند، مورفولوژی سلول‌ها نیز دستخوش تغییراتی قرار می‌گیرد که طی آن سلول‌های تمایزنیافته کوچک‌تر از سلول‌های تمایزیافته به نظر رسیده و از لحاظ کاریوپلاسم و اندامک‌ها نیز به ترتیب میزان بالاتر و میزان کمتری را در مقایسه با سلول‌های تمایزیافته دارا می‌باشند. در سطوح عملکردی، سلول‌های تمایزنیافته توانایی بیشتری جهت تبدیل شدن به انواع وسیعی از سلول‌ها نسبت به سلول‌های تمایزیافته دارند [۸].

با این حال، مشکل زمانی بروز می‌کند که روش برنامه‌ریزی مجدد باید مورد انتخاب واقع شود. چندین راه برای بازگرداندن مجدد تمایز وجود دارد، اما هیچکدام از آنها توانایی انجام این کار را بدون استفاده از وکتورهای ویروسی، الحاق سلولی یا با امنیت تضمین‌شده، مثل آنچه که در شرایط حیاتی رخ می‌دهد، ندارند.



[ Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2024-03-19 ]

[ DOR: 20.1001.1.17353165.1395.15.4.7.8 ]

*جدول ۱- تولید سلول‌های بنیادی پرتوان القائی در حیوانات*

| | نام حیوان | نوع سلول مورد استفاده | ژن‌های فاکتورهای پرتوانی | روش مورد استفاده | منبع |
|---|---|---|---|---|---|
| ۱ | خوک تبتی | سلول‌های فیبروبلاست | Sox2,Klf4,Oct4,C-myc موشی | سیستم بیانی رتروویروسی | Esteban و همکاران (۲۰۰۹) |
| ۲ | خوک | سلول‌های فیبروبلاست جنینی | Sox2,Klf4,Oct4,C-myc انسانی | سیستم بیانی رتروویروسی | Ezaschi و همکاران (۲۰۰۹) |
| ۳ | خوک | سلول بالغ خوک | Sox2,Klf4,Oct4,C-myc موشی | سیستم بیانی لنتی‌ویروسی القاشونده با دارو (داکسی‌سیکلین) | Wu و همکاران (۲۰۰۹) |
| ۴ | خوک | سلول‌های بنیادی مزانشیمی خوک | Sox2,Klf4,Oct4,C-انسانی myc,Nanog,Line28 | سیستم بیانی رتروویروسی | West و همکاران (۲۰۱۰) |
| ۵ | گاو | سلول‌های فیبروبلاست جنینی گوساله | Sox2,Klf4,Oct4,C-گاوی myc,Nanog,Line28 | سیستم بیانی رتروویروسی | Han و همکاران (۲۰۱۱) |
| ۶ | گوسفند | سلول‌های فیبروبلاست | Sox2,Klf4,Oct4,C-انسانی myc | سیستم بیانی لنتی‌ویروسی القاشونده با آنتی‌بیوتیک (تتراسایکلین) | Li و همکاران (۲۰۱۱) |
| ۷ | گوسفند | سلول‌های پیکری گوسفند | Sox2,Klf4,Oct4,C-انسانی myc,Nanog,Line28, hTERTوSV40 large T | سیستم بیانی لنتی‌ویروسی القاشونده با دارو | Bao و همکاران (۲۰۱۱) |
| ۸ | بز | سلول‌های فیبروبلاست گوش | Sox2,Klf4,Oct4,C-انسانی myc | سیستم بیانی لنتی‌ویروسی القاشونده با دارو (داکسی‌سیکلین) | Ren و همکاران (۲۰۱۱) |
| ۹ | اسب | سلول‌های فیبروبلاست | Sox2,Klf4,Oct4,C-انسانی myc | سیستم بیانی مبتنی بر ترانسپوزون Piggy Bac | Nagy و همکاران (۲۰۱۱) |
| ۱۰ | سگ | سلول‌های فیبروبلاست بالغ | Sox2,Klf4,Oct4,C-انسانی myc | سیستم بیانی رتروویروسی | Luo و همکاران (۲۰۱۱) |
| ۱۱ | موش | سلول‌های فیبروبلاست گوش سلول‌های بنیادی مزانشیمی بافت چربی | Sox2,Klf4,Oct4,C-موشی myc | سیستم بیانی غیرویروسی القاشونده | Merkl و همکاران (۲۰۱۳) |
| ۱۲ | میمون رزوس | سلول‌های فیبروبلاست گوش میمون رزوس | Klf4,Oct4 | سیستم بیانی رتروویروسی | Fang و همکاران (۲۰۱۴) |
| ۱۳ | ز شیری | سلول‌های فیبروبلاست جنینی بز شیری | Sox2,Klf4,Oct4,C-myc انسانی | سیستم بیانی لنتی ویروسی | Chu و همکاران (۲۰۱۵) |

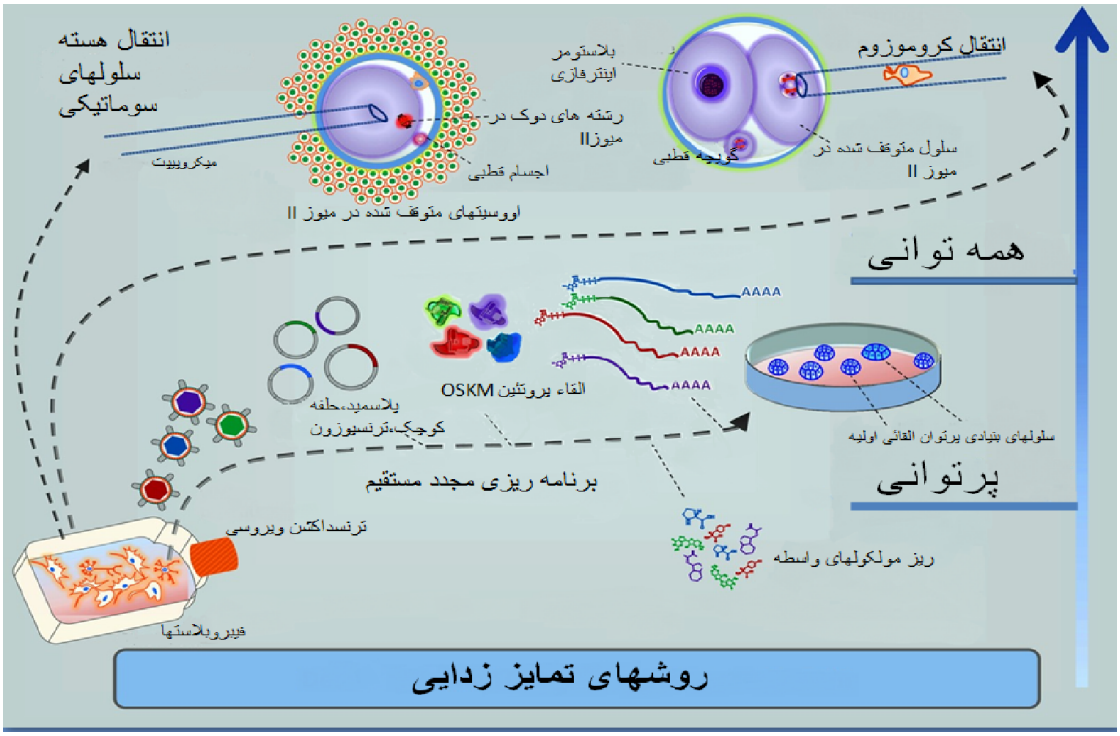


[ Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2024-03-19 ]

[ DOR: 20.1001.1.17353165.1395.15.4.7.8 ]

### ۳-۱ روش‌های تمایززدایی

روش‌های متفاوتی جهت انجام برنامه‌ریزی مجدد تاکنون شناسایی شده‌اند (شکل ۲ و جدول ۲). در این زمینه تحقیقات زیادی در مورد تعیین کارآمدترین رده سلولی در رابطه با از بین رفتن تمایز انجام گرفته است.




***شکل ۲- روش‌های تمایززدایی جهت تولید سلول‌های بنیادی پرتوان القائی***

#### ۳-۱-۱ انتقال هسته‌ای

انتقال هسته سلول‌های پیکری (Somatic Cell Nuclear Transfer=SCNT) فرایندی است که طی آن هسته یک سلول پیکری به یک اووسیت بالغ فاقد هسته انتقال می‌یابد. این انتقال، یک بازآرایی ناکامل اپی‌ژنتیکی در هسته‌های سلول پیکری ایجاد می‌کند که سلول را بدون برنامه‌ریزی مجدد که به طور طبیعی طی تکوین اتفاق می‌افتد به سمت تشکیل حالت پرتوانی سوق می‌دهد [۹-۱۰]. توانایی اووسیت جهت برنامه‌ریزی مجدد، به نوع سلول‌های اهداکننده بستگی دارد. هسته سلول‌هایی که تمایز کمتری پیدا کرده‌اند، در مقایسه با سلول‌های تمایزیافته‌تر، تکوین بهتری را نشان می‌دهند. با توجه به این موضوع که برنامه‌ریزی مجدد در طی فرایند کلونینگ، به صورت تصادفی اتفاق می‌افتد، بنابراین بسیاری از نقص‌ها زمانی پدیدار می‌شوند که فرایند به صورت کامل انجام نپذیرد. در این میان، نقص‌هایی که در مراحل نشانه‌گذاری، متیلاسیون DNA و یا به صورت ژنتیکی در یک ژن خاص و یا در توالی‌های تکراری و به صورت اپی‌ژنتیکی شامل تغییرات وسیع در بیان ژن، استیلاسیون و متیلاسیون هیستون‌ها دیده می‌شود، می‌تواند بر روی



[ Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2024-03-19 ]
[ DOR: 20.1001.1.17353165.1395.15.4.7.8 ]

فعال‌سازی کروموزوم X تأثیرگذار باشد [۱۰]. تنها هسته‌هایی که تحت برنامه‌ریزی مجدد اپی‌ژنتیکی قرار گرفته‌اند، قادر به تولید سلول‌های بنیادی جنینی به روش SCNT هستند [۹].

***جدول ۲- روش‌های تولید سلول‌های بنیادی پرتوان القائی***

| روش | تکنیک | مزایا | معایب | کارایی |
|---|---|---|---|---|
| انتقال هسته سلول سوماتیک | هسته سلول پیکری با یک اووسیت بدون هسته امتزاج داده می‌شود. | رده‌های سلولی انسان می‌توانند به همراه امتزاج هملوگ ایجاد گردند. | نتایج برنامه‌ریزی اپی‌ژنتیکی مجدد جهت پیش‌بینی، ناکارآمد می‌باشد. | - |
| عصاره سلولی | به منظور بیان پروفایل‌های سلول‌های بنیادی جنینی، سلول‌های تمایزیافته با آنها مخلوط و کشت می‌شوند. | این روش علاوه بر این که امکان آنالیزهای بیوشیمیایی و کینتیکی برنامه‌ریزی مجدد را فراهم می‌سازد، امکان استفاده از نتایج حاصله جهت شناسایی فاکتورهای دخیل در برنامه‌ریزی را نیز مهیا می‌کند. | در صورتی که پروفایل بیانی پروتئین سلول هدف با تولید پروتئین عصاره سلولی مرتبط باشد، باعث ایجاد مشکل می‌شود. | - |
| بیان اجباری فاکتورهای مشخص | انتقال و بیان ترکیبی از سری فاکتورهای ایجاد کننده پرتوانی از جمله **oct4,sox2** و ... درسلول‌های بنیادی جنینی | روشی است که بیشترین مطالعات با استفاده از آن صورت پذیرفته و دارای بالاترین کارایی در میان روش‌های مورد استفاده در تولید سلول‌های بنیادی پرتوان القائی می‌باشد | استفاده از رتروویروس و آدنوویروس زمانی که آنها به درون ژنوم میزبان تلفیق گردند، می‌تواند به فعال‌سازی مجدد ژن‌های سرطانی منجر گردد. | کارایی این روش بسته به رده سلولی بین ۰/۰۰۱ تا ۴/۴٪ محاسبه شده است. |
| مولکول‌های سنتتیک | ترکیبات دارای وزن مولکولی پایین به عنوان معرف برنامه‌ریزی مجدد به کار می‌روند. | به عنوان ابزاری مناسب جهت کنترل سرنوشت سلول‌های بنیادی و هم‌چنین جهت درک بهتر فرایندهای تکاملی به کار می‌رود. | ترکیب منفرد از مولکول‌های سنتتیک قابلیت تولید سلول‌های بنیادی پرتوان القائی را ندارد. | استفاده از ترکیبات با وزن مولکولی پایین امکان افزایش ۲/۶ تا ۱۰۰ برابر کارایی برنامه‌ریزی مجدد را، زمانی که با بیان اجباری فاکتورهای مشخص همراه شوند، میسر می‌سازد. |
| میکرو RNA | هدف این روش تغییر پروفایل ساخت پروتئین سلولی با استفاده از میکرو**RNA** می‌باشد. | هنگامی که با بیان اجباری ژن‌های مشخص همراه شوند، **mir290** می‌تواند جایگزین **c-Myc** شود. | برهم‌کنش‌های بین میکرو**RNA**ها و فاکتورهای نسخه‌برداری به خوبی شناخته نشده است. | - |



[ Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2024-03-19 ]

[ DOR: 20.1001.1.17353165.1395.15.4.7.8 ]

**۱-۳-۲ عصاره‌های سلولی**

این تکنیک شامل استفاده از عصاره سلول تمایزیافته، سلول‌های بنیادی پرتوان و یا سلول‌های بنیادی جنینی است [۱۱]. نتایج حاصل از این تکنیک بسیار جالب می‌باشند، به طوری که امکان خالص‌سازی ترکیبات پروتئینی با قابلیت برنامه‌ریزی مجدد را فراهم می‌کنند [۱۲]. آزمایش‌هایی که با استفاده از عصاره تخم زنوپوس (Xenopus) انجام پذیرفت، نشان داد که کارایی بازآرایی بخش کروماتینی هستهٔ تمایزیافته، به در معرض قرار گرفتن با عصاره تخم میتوزی بستگی دارد که این باعث تسهیل همانندسازی DNA جنینی می‌شود [۱۴-۱۲]. Bru و همکارانش ژن‌های Oct4، Sox2، Klf4 و c-MYC (OSKM) را پس از قرار دادن فیبروبلاست‌ها در معرض عصاره سلول‌های بنیادی جنینی، به درون ژنوم فیبروبلاست انتقال دادند [۱۵]. Freberg و همکارانش با انتقال ژن‌های Oct4 و Nanog به سلول‌های کلیه جنینی انسان که از طریق مواجهه آن با عصاره سلول‌های کارسینومای جنینی انجام پذیرفت، توانستند موفق به انجام برنامه‌ریزی متیلاسیون DNA و تغییرات هیستونی بر روی ناحیه تنظیمی این ژن‌ها شوند [۱۱]. فیبروبلاست‌هایی که در معرض عصاره سلول‌های بنیادی جنینی موش قرار گرفتند، نشان دادند که یک القاء قدیمی ژن Oct4 در آن‌ها وجود داشته است که بیان آن باعث دمتیلاسیون DNA و نگه داشتن آن در حد پایه می‌شود [۱۳]. یکی از معایب این روش، مشکل بودن نتیجه‌گیری در مدت زمان کوتاه است که بتوان تشخیص داد که آیا الگوی بیان پروتئین سلول هدف با تولید پروتئین خود سلول بر اساس فعال‌سازی مجدد ژن‌های حالت پایه‌ای یکسان است یا خیر، و یا اینکه آیا این الگوی بیان در سلول‌های در حال رشد، نتیجهٔ بیان گذرای ژن‌هایی است که در عصاره وجود دارند یا خیر [۱۱]. از طرف دیگر، مشخص نیست که این سلول‌ها به طور کامل از لحاظ رونویسی و ظرفیت تمایزی قادر به ایجاد سه لایه زاینده پرتوان هستند یا خیر. بنابراین Cho و همکارانش [۱۶] با تیمار سلول‌های پیکری ابتدایی با یک عصاره پروتئینی مشتق شده از سلول‌های بنیادی جنینی توانستند پروتئین‌های سلول‌های بنیادی پرتوان القائی را که خصوصیات سلول‌های بنیادی جنینی از قبیل عملکرد آن‌ها در شرایط آزمایشگاهی و پتانسیل تکوینی آنها در شرایط حیاتی را شبیه‌سازی می‌کنند، ایجاد نمایند.

**۱-۳-۳ بیان اجباری ژن‌های مشخص**

انتقال ژن‌های Oct4، Sox2، Klf4 و c-MYC (OSKM) به سلول‌های پیکری و جنینی باعث ایجاد خصوصیات شبیه به سلول‌های بنیادی می‌شوند [۱۷-۹]. ترکیبات متفاوت ژنی از جمله Nanog [۱۸]، Stat3 [۳]، LIN28[۱۹-۱۸]، Esrrb [۲۰]، Sv40LT [۲۳-۲۱]، UTF-1 [۲۵-۲۴]، P53، SiRNA [۲۴]، hTERT [۲۳]، WNT3a [۲۶] و Nr5a1 [۲۷] در آزمایش‌های مختلف، مورد استفاده قرار گرفته‌اند که ثابت شده برخی از آنها کارآمدی برنامه‌ریزی مجدد را افزایش می‌دهند یا اینکه قادرند جایگزین یکی از ژن‌های OSKM شوند. برای انتقال این ژن‌ها از روش‌های الحاقی و غیرالحاقی استفاده شده است که در جدول ۳ به این روش‌ها و مزایا و معایب آنها به صورت کلی اشاره شده است.



[ Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2024-03-19 ]

[ DOR: 20.1001.1.17353165.1395.15.4.7.8 ]

***جدول ۳- روش‌های تلفیقی و غیر تلفیقی در تولید سلول های بنیادی پرتوان القائی***

| معایب | مزایا | روش مورد استفاده | طبقه‌بندی روش |
|---|---|---|---|
| الحاق به ژنوم | کارا و قابل تکثیر | رتروویروس‌ها<br>لنتی ویروس‌ها | روش تلفیقی |
| احتمال الحاق به ژنوم و کارایی متوسط | عاری از وکتور | RNA خطی | |
| کند و کارایی پایین و احتمال الحاق ژنومی | حذف وکتور احتمالی | ترانسپوزون PiggyBac | |
| کند و غیرکارا | هیچ الحاق ژنومی وجود ندارد | آدنوویروس | روش غیرتلفیقی |
| رقت دوز ژن‌ها و ناکارامدی و احتمال الحاق به ژنوم | هیچ الحاق ژنومی وجود ندارد | پلاسمیدهای اپیزومال | |
| ناکارامدی و کندی | عاری از ترانس‌ژن | پروتئین‌ها و مولکول‌های کوچک | |
| دوز بالای ژن‌های پیش‌سرطان‌زا و نیاز به عوامل ترانسفکشن چندگانه | عاری از ترانس‌ژن و کارا | mRNA | |
| معمولاً در ترکیب با دیگر روش‌ها همراه با موفقیت است. | عاری از ترانس‌ژن | miRNA | |

### ۱-۳-۳-۱ روش‌های الحاقی

مشکل اصلی این روش استفاده از ناقل‌های رتروویروسی، لنتی‌ویروسی یا آدنوویروسی برای وارد کردن ژن‌های تمایززدا می‌باشد. رتروویروس‌ها زمانی که به طور کامل به داخل ژنوم سلول راه یابند، قادرند سبب فعال‌سازی مجدد ژن‌های سرطانی شوند [۲۹-۲۸]. از طرف دیگر وکتورهای آدنوویروسی توانایی راهیابی و تلفیق به داخل ژنوم سلول میزبان را به میزان بسیار پائین‌تری دارند که این مسئله، دلیل احتمالی میزان پایین کارآیی گزارش شده در رابطه با آنها می‌باشد [۳۱-۳۰]. راه‌اندازهای القاپذیر و ثابت لنتی‌ویروسی همانند وکتورهای لنتی‌ویروسی با قابلیت حذف از ژنوم (excisable) و القاءپذیری با آنتی‌بیوتیک داکسی سایکلین (doxycycline inducible) مورد استفاده قرار می‌گیرند [۳۳-۳۲]. بدون شک، کاری که در سال ۲۰۰۶ به وسیله Takashi و همکارانش گزارش شد ـ که طی آن سلول‌های پیکری موشی را با استفاده از OSKM به سلول‌های بنیادی پرتوان القائی تبدیل کردند ـ جهشی بزرگ در علم سلول‌های بنیادی تلقی می‌گردد [۱۷]. یک سال بعد آنها موفقیت خودشان را با استفاده از فیبروبلاست‌های انسانی تکرار کردند [۳۴]. گروه‌های مختلفی بر روی روش‌های کاهش تعداد ژن‌های دخیل در فرایند تمایززدایی کار می‌کنند. با وجود این، اگرچه این روش‌ها تعداد ژن‌های دخیل در این فرایند را کاهش می‌دهند، اما از طرفی نیاز به اینکه سلول در مراحل ابتدایی‌تری از تکوین قرار داشته باشد را افزایش می‌دهند [۳۸-۳۵]. پس مسئله نهایی که



[ Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2024-03-19 ]
[ DOR: 20.1001.1.17353165.1395.15.4.7.8 ]

باقی می‌ماند این است: یافتن تعداد حداقل از ژن‌های لازم که بتوانند سلول‌های پیکری را به مرحله پرتوانی برسانند. تاکنون در این تحقیقات از سلول‌های مختلفی شامل سلول‌های کبدی موشی (murine hepatic cells) [۱۷]، فیبروبلاست‌های جنینی یا بالغ موشی [۳۹-۳۴] یا فیبروبلاست‌های جنینی و بالغ انسانی [۴۱-۳۷]، کراتینوسیت‌ها [۳۵]، لنفوسیت‌ها [۴۲]، هپاتوسیت‌ها [۱۳]، بافت چربی [۴۸-۴۳]، سلول‌های مغز [۴۹]، طحال [۲۸]، پیش‌سازهای عصبی، غدد فوق‌کلیوی، سلول‌های عضلانی، سلول‌های پوششی روده، سلول‌های بنیادی مزانشیمی [۴۸-۴۶]، سلول‌های استرومای مزانشیمی، سلول‌های آمنیونی، سلول‌های بندناف، سلول‌های بنیادی پالپ دندان و سلول‌های بتای لوزالمعده برای این آزمایش‌ها استفاده شده است. بهترین نتیجه با سلول‌های چربی و کراتینوسیت‌ها به دست آمد، به طوری که کارآمدی تمایززدایی بیش از ۰٫۱٪ بود که به میزان ۱۰۰ برابر کارآمدتر و دو برابر سریع‌تر از برنامه‌ریزی مجدد فیبروبلاست‌های انسانی با استفاده از وکتورهای DNA بود [۳۵]. استفاده از وکتورهای رتروویروسی، لنتی‌ویروسی و آدنوویروسی به تنهایی می‌توانند موضوعی برای تمرکز کردن باشند. Sommer و همکارانش [۱۷] ناقل لنتی‌ویروسی را با استفاده از پپتید 2A (روشی است که از آن برای بیان سیستم دوسیسترونی با استفاده از روش انتقال ژن به وسیله ناقلین ویروسی استفاده می‌شود) و تکنولوژی جایگاه داخلی ورودی ریبوزوم و چهار فاکتور رونویسی (OSKM) طراحی کردند که کارآیی آن چند برابر پژوهش‌های قبلی بود و میزان کارآیی آن به بیش از ۰٫۵٪ رسید. در ادامه آن تحقیقاتی با استفاده از روش‌های پلی‌سیسترونیک و نوترکیبی‌های همولوگ نیز گزارش شده است که کارایی آن‌ها ۵ برابر بیشتر از روش‌های مونوسیسترونیک با وکتورهای تک‌ژنی است [۵۱]. استفاده از سیستم‌های نوترکیب همولوگ، که از جایگاه‌های LoxP برخوردار می‌باشند، گام‌های ابتدایی به سمت روش‌های غیرالحاق‌شونده را نمایان می‌کند: این روش‌ها خطرات انکوژنیک را با حذف ترانس‌ژن رفع می‌کند. Kaji و همکارانش [۵۲] در تحقیقات‌شان توانستند با به کاربردن یک وکتور غیرویروسی منحصر به فرد با استفاده از ترکیب پپتید 2A و سیستم ترانسپوزون piggyback و فاکتورهای رونویسی، به طور کارآمدی سلول‌های فیبروبلاست جنینی موش (MEF) و فیبروبلاست‌های انسان را تمایززدایی کنند. کارایی برنامه‌ریزی مجدد این کار بیش از ۲٫۵٪ بود.

**۱-۳-۳-۲ روش‌های غیرتلفیقی** (Non-integrative) **در ژنوم**

سلول‌های بنیادی پرتوان القائی برای نخستین بار توسط انتقال چهار فاکتور مشخص به وسیله ناقلین رتروویروسی تولید شدند که روشی مؤثر و کارامد است. با وجود این، باید جهت کاربردهای بالینی حتی‌الامکان از ادغام ویروس به ژنوم جلوگیری به عمل آید که علت این امر فعال شدن غیرمنتظره ترانس‌ژن‌های سرطانی یا تخریب ژنوم می‌باشد که در اثر تشکیل تومور احتمالی رخ می‌دهد. بسیاری از تحقیقات حاکی از فائق آمدن بر این مشکل است. Soldner و همکارانش از ناقل لنتی‌ویروسی که توانایی آلوده کردن سلول‌هایی که در حال تقسیم و



[ Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2024-03-19 ]

[ DOR: 20.1001.1.17353165.1395.15.4.7.8 ]

تکثیر نباشند را دارا بوده و علاوه بر آن، حاوی توالی loxP در قسمت ´۳ ناحیه تکراری انتهایی (LTR) بوده را جهت انتقال فاکتورهای تمایززدایی به سلول استفاده کردند. در این مطالعه، پس از اتمام فرایند تمایززدایی در سلول، توالی loxP که ناحیه ترانس‌ژن در میان آن قرار داشت توسط آنزیم Cre-recombinase شناسایی و حذف گردید. پس از ترکیب و رفع توالی‌های ترانس‌ژن، سلول‌های بنیادی پرتوان القائی حالت پرتوانی خود را حفظ کردند. چهار روش جهت غلبه بر خطرات حاصل از روش تلفیقی شناسایی شده‌اند که شامل ویروس‌های غیرادغام‌شونده به ژنوم و پلاسمیدهای اپیزومی و سیستم‌های تحویل RNA (Delivery Systems) و پروتئین می‌باشند [۵۵-۵۳]. در روش‌های غیرتلفیقی از آدنوویروس ایجادکننده نقص در همانندسازی و یا وکتورهای ویروسی سندایی F-deficient استفاده می‌کنند. روش‌های غیرتلفیقی اپیزومال غیرهمانندساز [۶۰-۵۶] یا همانندساز [۲۱] امکان تولید سلول‌های بنیادی پرتوان القائی فاقد پلاسمید را تضمین نکردند؛ به طوری که با استفاده از اپیزومال غیرهمانندساز و همانندساز، تنها ۳۳٪ و ۸٪ از کل سلول‌های القاءشده هیچ اثری از تلفیق پلاسمید را نشان ندادند. هم‌چنین، از پلاسمیدهای دیگر مورد استفاده، پلاسمیدهای مبتنی بر ویروس ابشتین‌ـ بار هستند که پایداری آنها بیشتر است و می‌توانند جهت بیان عوامل برنامه‌ریزی‌شده مجدد برای تولید سلول‌های بنیادی پرتوان القائی مورد استفاده قرار گیرند. مسئله مهمی که در رابطه با این پلاسمیدها وجود دارد، استفاده از پروتئین سرطانی SV40LT به عنوان عامل برنامه‌ریزی مجدد می‌باشد که احتمال ایجاد سرطان‌زایی را بالا می‌برد [۲۱]. یک روش جایگزین برای این تکنیک توسط jia و همکاران پیشنهاد شده که درآن با استفاده از ناقل‌های مینی‌حلقوی غیرالحاقی به ژنوم، که اندازه آنها در مقایسه با اپیزوم کوچک‌تر می‌باشد، میزان کارایی در تولید سلول‌های بنیادی پرتوان القائی که در مدت ۱۴-۱۶ روز ایجاد شدند، افزایش چشمگیری یافت [۶۰]. به منظور حذف کامل وکتورهای ویروسی یا پلاسمیدی یک روش پیشنهادی، تبدیل RNA (conversion) بود. کارایی این روش با استفاده از فیبروبلاست به بیش از ۴/۴٪ رسید [۶۱] که این میزان بالاترین میزان کارایی بدست آمده تا کنون است. با این حال میزان ژن مورد نیاز جهت انتقال آن‌ها آنقدر زیاد است که می‌تواند احتمال بروز خطر سرطان‌زایی را افزایش دهد. سلول‌های بدست آمده طی این روش به عنوان pIPSC (partially induced pluripotent stem cells) شناخته می‌شود. در این روش، پروتئین‌های نوترکیب با پپتیدهای واسطه‌گر انتقال در حضور [۵۴] یا غیاب والپوریک اسید (vpa) تولید می‌شوند [۵۵]. اما این روش از لحاظ کینتیکی کند بوده و کارایی پایینی دارد. علاوه بر این تولید پروتئین و خالص‌سازی آن یک فرایند پیچیده است که قابلیت تجدید آزمایشگاهی آنرا تضمین نمی کند.

**۱-۳-۳-۲-۱ مولکول‌های مصنوعی**

شناسایی ترکیباتی با وزن مولکولی پایین که به عنوان عوامل برنامه‌ریزی مجدد عمل می‌کنند یکی از موضوعات مرتبط با شیمی در مبحث کشت سلول‌های بنیادی است که می‌تواند راهی مطمئن، سریع و کارآمد برای برنامه‌ریزی مجدد سلول‌های پیکری با کاربردهای حیاتی



[ Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2024-03-19 ]

[ DOR: 20.1001.1.17353165.1395.15.4.7.8 ]

باشد. استفاده از ترکیب کوچکی به نام Reversia قابلیت القاء برنامه‌ریزی مجدد سلولی در میوبلاست‌های C2C12 را نشان می‌دهد که سلول‌هایی با قابلیت تمایز به استخوان (Osteocyte Differentiation) و چربی (Adipocyte Differentiation) را ایجاد می‌کند [۶۲]. در سال‌های اخیر به طور عمده‌ای ممانعت‌کننده‌های DNA متیل‌ترانسفراز و هیستون‌داستیلاز (HDAC) جهت افزایش کارایی برنامه‌ریزی مجدد با استفاده از بیان اجباری ژن‌های مشخص و یا تکنیک‌های انتقال هسته سلول‌های پیکری به کار رفته‌اند. رایج‌ترین ممانعت‌کننده‌های HDAC شامل Suberoylanide hidroxamic acid (SAHA)، Trichostatin A (TSA) و والپروئیک اسید (VPA) می‌باشند. حتی معروف‌ترین ممانعت‌کننده‌های DNA متیل‌ترانسفراز که شامل ۵-آزاسیتیدین (5-azaC)، RG108 و BIX-01294 هستند به منظور یافتن میزان کارایی‌شان هنوز هم تحت تحقیقات قرار دارند [۶۴-۶۳]. هم‌چنین، استروئید گلوکوکورتیکوئید دگزامتازون، ممانعت کننده TGF-β، A-83-01 [۶۵] و آگونیست Bay K 8644 [۶۵] در حال مطالعه می‌باشند. مهم‌ترین این ترکیبات و عملکرد آنها در جدول ۴ آمده است.

در آزمایش‌هایی، ژن‌های Oct4، Sox2، Klf4 و c-MYC درون سلول‌های MEF (Mouse embryonic fibroblast) بیش‌بیان شدند و سپس با در معرض قرار گرفتن این سلول‌ها با ۵-آزاسیتیدین و دگزامتازون، کارایی برنامه‌ریزی مجدد داخل این سلول‌ها به ترتیب ۱۰ و ۲،۶ برابر افزایش یافت. از طرف دیگر زمانی که از VPA استفاده شد، کارایی آزمایش تا ۱۰۰ برابر بیشتر از آزمایش‌های کنترل و در حالت وابسته به دوز افزایش یافت. به نظر می‌رسد که VPA یک مرحله کنترل‌کننده سرعت را در برنامه‌ریزی مجدد کنترل کند، اما به تنهایی برای برنامه‌ریزی مجدد MEF کافی نیست [۳۰]. هنگامی که سه ژن OSK استفاده می‌شود، ۵-آزاسیتیدین برنامه‌ریزی مجدد را سه برابر بهبود می‌بخشد، در حالی که VPA بیش از ۵۰ برابر آن را بهبود می‌بخشد. اخیراً Li و همکارانش [۳۶] موفق به ایجاد سلول‌های بنیادی پرتوان القائی از فیبروبلاست جنینی و بالغ موشی در حضور ژن Oct4 به تنهایی و یا در ترکیبی از مولکول‌های مصنوعی شدند. ترکیبات با وزن مولکولی پایین برای کنترل سرنوشت سلول‌های بنیادی و نیز درک بیشتر فرایندهای تکوینی می‌توانند مفید باشند [۷]. اما سؤال همچنان باقی می‌ماند که آیا روزی خواهد رسید که برنامه‌ریزی مجدد سلول با استفاده از یک روش شیمیایی خالص انجام شود؟



[ Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2024-03-19 ]

[ DOR: 20.1001.1.17353165.1395.15.4.7.8 ]

*جدول ٤- ترکیبات سنتتیک و عملکرد آن‌ها*

| ترکیب | عملکرد |
|---|---|
| Valproic acid | مهارکننده هیستون داستیلاز |
| Trichostatin A | مهارکننده هیستون داستیلاز |
| Sodium Butyrate | مهارکننده هیستون داستیلاز |
| BIX-01294 | مهارکننده هیستون متیل ترانسفراز |
| Pamate | مهارکننده هیستون دمتیلاز |
| 5-azacytidine | مهارکننده DNA متیل ترانسفراز |
| RG108 | مهارکننده DNA متیل ترانسفراز |
| SB431542+PD0325901 | مهارکننده ALK5+ مهارکننده MEK |
| A-83-01 | مهارکننده پذیرنده TGF-□ |
| CHIR99021 | مهارکننده GSK3 |
| RepSox | مهارکننده Tgfbr1 کیناز |
| PS48 | فعال‌کننده PDK1 |
| Vitamin C | ماده غذایی ضروری |

**۱-۳-۳-۲-۲ miRNA**

هدف این روش تغییر الگوی سنتز پروتئین‌های سلول است. با کشف RNAهای کوچک (MicroRNAs)، یک افق جدید در مسیرهای تمایزی که توسط آن‌ها به انجام می‌رسد، نمایان شد [۹]. هنوز به درستی درک نشده است که چگونه فاکتورهای رونویسی و miRNA با هم میان‌کنش دارند. اعتقاد بر این است که miRNA، حالت پایدار فیزیولوژیکی سلول‌های تمایزیافته را حفظ می‌کند تا اینکه تمایز سلول را راه‌اندازی کند. پاسخ سلولی به فاکتورهای خارجی که بیان ژن را برنامه‌ریزی مجدد می‌کنند با تغییر بارگذاری (Load) آنها می‌تواند بهبود یابد و این سبب سازگاری بیشتر سلول برای کسب حالت پرتوانی می‌شود [۹]. آزمایش‌هایی با استفاده از میکرو mir-302 RNA در رده‌های سلول‌های سرطانی PC3 و Colo انجام شده است؛ به طوری که سلول‌های بنیادی پرتوان القائی توسط miRNA که تمایز در آن‌ها از بین رفته بود، قادر به تمایز به سلول‌های پیش‌ساز شبه‌نورونی، غضروفی، فیبروبلاستی و اسپرماتوگونی بودند [۹]. مجموعه mir-290 (Cluster) در MEFها مورد ارزیابی قرار گرفت. آزمایش‌ها نشان می‌دهند که این مجموعه، کارایی تمایززدایی را با بیان اجباری ژن OSK افزایش می‌دهد. شاید miRNA بتواند جایگزین ژن c-MYC در پیش‌برد تمایززدایی سلول‌های بنیادی شود. RNAهای کوچک می‌توانند جایگزین فاکتورهای اضافی شوند که در حقیقت جایگزین استفاده از عناصر DNA انتقال‌یافته را فراهم می‌سازند [۶۷]. بیان افزایش‌یافته miRNA-145 از



[ Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2024-03-19 ]

[ DOR: 20.1001.1.17353165.1395.15.4.7.8 ]

خودنوزایی سلول‌های بنیادی جنینی انسان جلوگیری می‌کند، هم‌چنین بیان ژن‌های پرتوانی را سرکوب کرده و تمایز مجدد رده سلولی را القاء می‌کند [۶۸]. اگر بازدهی آلودگی با miRNAها افزایش یابد و همچنین یک مجموعه استانداردی از miRNAهای دخیل در فرایند برنامه‌ریزی مجدد شناسایی شوند، این روش می‌تواند روش امیدوارکننده‌ای برای تولید سلول‌های بنیادی پرتوان القائی محسوب شود.

**چشم‌اندازهای آینده**

روش‌های بسیار زیادی تاکنون شناسایی شده‌اند؛ اما تا شناسایی بهترین روش، هنوز به تحقیقات بیشتری نیاز می‌باشد. بدون شک، قسمت عمده تلاش‌ها به فرایندهای سریع‌تر، مطمئن‌تر و کارامدتر تمرکز یافته‌اند. بیان اجباری ژن‌های مشخص، روشی است که بیش از بقیه، مورد مطالعه قرار گرفته است. بیشترین تلاش‌های تحقیقاتی بر مکانیسم‌های غیرتلفیقی و بهینه‌سازی ترکیب ژنی مورد نیاز برای تولید سلول‌های بنیادی پرتوان القائی متمرکز شده است [۶۸]. با وجود این که استفاده از پروتئین نوترکیب مطمئن‌تر است، اما نتایجی که تاکنون بدست آمده، امیدوارکننده نیست؛ زیرا که این روش غیرکارامد با سرعت پایین عمل می‌کند [۵۵-۵۴]. با این که ثابت شده است فعالیت مولکول‌های مصنوعی کارایی را افزایش می‌دهد، اما شیمیدان‌ها و بیولوژیست‌ها باید برای تولید یا شناسایی گروهی از مولکول‌های با وزن مولکولی پایین که بتوانند به عنوان فاکتورهای رونویسی عمل کنند و جایگزین عصاره‌های پروتئینی شوند، با هم کار کنند تا بتوانند سلول‌های بنیادی پرتوان القائی را بدون استفاده از ژن‌ها تولید کنند. استفاده از miRNA هنوز یک پیشنهاد امیدوارکننده است. زمانی که درک دقیق‌تری از این نوع RNA و نقش آن در فرایند تمایززدایی به دست آید، مشکل روش غیرتلفیقی با استفاده از این تکنیک حل خواهد شد. کارایی و مشکلات مربوط به روش غیرتلفیقی به عنوان عمده‌ترین مشکلات مطرح است. خصوصیات سلول‌های بنیادی پرتوان القائی همچون بازآرایی اپی‌ژنتیک، قابلیت پایداری، خصوصیت رونویسی و الحاق ژنومی نباید دست‌کم گرفته شوند و باید پتانسیل تومورزایی آنها مورد آنالیز قرار گیرد. پس می‌توان گفت که سلول‌های بنیادی پرتوان القائی، در واقع سلول‌های بنیادی جنینی را شبیه‌سازی می‌کند و می‌تواند به عنوان جایگزین آنها برای استفاده در سلول درمانی به کار رود [۶۸-۶۷].

## نتیجه‌گیری

برای رسیدن به سطح کاربردی و کلینیکی این تکنیک، مشکلات زیادی باقی مانده‌اند که هنوز حل نشده‌اند. امیدوارکننده‌ترین روش، بیان اجباری ژن‌هاست. عمده‌ترین قسمت تلاش‌های تحقیقاتی بر این موضوع تمرکز یافته است. بزرگترین مشکل استفاده از وکتورهای ویروسی این است که آنها قادر به فعال‌سازی مسیرهای انکوژنیک هستند و از طرفی روش‌های غیرتلفیقی، با تمامی مزایای خود، هنوز قادر نیستند نتایج کارایی را ارائه دهند. جستجوی راه حل‌های اجرایی، اخلاقی و اقتصادی برای مشکلات زیست‌درمانی مرتبط با ترمیم بافت، برجسته‌ترین مفهومی است که تلاش‌های گروه‌های تحقیقاتی را در سراسر جهان به این شبکه معطوف می‌دارد. تکنیک‌های گوناگونی شناخته شده و نتایج



[ Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2024-03-19 ]

[ DOR: 20.1001.1.17353165.1395.15.4.7.8 ]

نویدبخشی به دست آمده است. بر اساس این نتایج، پژوهش‌ها باید دوباره تنظیم شوند. بیان اجباری ژن‌های مشخص و مولکول‌های مصنوعی، بالاترین پتانسیل را در این زمینه دارند، اما لازم است که آنها را باز کنیم و از نقطه نظرهای دیگر به مشکلات آنها نگاه کنیم. کارهای بسیار زیادی در دست انجام هستند. پژوهش‌های بیشتری جهت حل کردن مشکلات مکانیسم‌های سلولی و مولکولی پرتوانی سلول‌های بنیادی وجود دارد؛ از جمله، درک بهتر بازآرایی الگوی داخلی سلول که می‌تواند پاسخ بسیاری از سؤالات موجود باشد. این تکنیک باعث می‌شود که رده‌های خاصی از سلول‌های بنیادی یک بیمار برای مطالعه مکانیسم‌های بیماری متفاوت مورد استفاده قرار بگیرند و می‌تواند کارآمدی کشف دارو را افزایش دهد. این روش یک ابزار برای آزمایش‌های سم‌شناسی بوده و غربالگری بیمار و درمان‌های ترمیمی را ممکن می‌سازد و هم‌چنین از لحاظ اقتصادی نیز مقرون‌به‌صرفه‌تر است. دانشمندان در مقابل یک راه حل بسیار چالش‌برانگیز قرار دارند. در واقع، تمام تلاش‌های خلاصه‌بندی‌شده، در نهایت یک رویکرد بالینی را به دست می‌دهد که می‌تواند مسیر درمان بیماری‌ها را تغییر دهد.

## References


[1] Smith A. A glossary for stem-cell biology. *Nature* 2006; 441:1060.

[2] Pan GJ, Chang ZY, Schoeler HR, Pei D. Stem cell pluripotency and transcription factor Oct4. *Cell Research* 2002; 12(5-6): 321-29.

[3] Lucendo-Villarin B, Rashidi H, Cameron K, Hay DC. Pluripotent stem cell derived hepatocytes: using materials to define cellular differentiation and tissue engineering. *J Mater Chem* B 2016.

[4] Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 1981; 292(5819):154-56.

[5] Ellis J, Baum C, Benvenisty N, Mostoslavsky G, Okano H, Stanford WL, et al. Benefits of utilizing gene-modified iPSCs for clinical applications. *Cell Stem Cell* 2010; 7(4): 429-30.

[6] Inoue H, Yamanaka S. The use of induced pluripotent stem cells in drug development. *Clinical Pharmacology and Therapeutics* 2011; 89(5): 655-61.

[7] Sartipy P, Strehl R, Björquist P, Hyllner J. Low molecular weight compounds for in vitro fate determination of human embryonic stem cells. *Pharmacol Res* 2008; 58(2): 152-57.




[ Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2024-03-19 ]

[ DOR: 20.1001.1.17353165.1395.15.4.7.8 ]

[8] Cai S, Fu Z, Sheng Z. Dedifferentiation: a new approach in stem cell research. *Bioscience* 2007; 57(8): 655-62.

[9] Alberio R, Campbell KH, Johnson AD. Reprogramming somatic cells into stem cells. *Reproduction* 2006; 132(5): 709-20.

[10] Morgan HD, Santos F, Green K, Dean W, Reik W. Epigenetic reprogramming in mammals. *Hum Mol Genet* 2005; 14(1): R47-58.

[11] Freberg CT, Dahl JA, Timoskainen S, Collas P. Epigenetic reprogramming of OCT4 and NANOG regulatory regions by embryonal carcinoma cell extract. *Mol Biol Cell* 2007; 18(5): 1543-53.

[12] Hochedlinger K, Jaenisch R. Nuclear reprogramming and pluripotency. *Nature* 2006; 441(7097): 1061-67.

[13] Taranger CK, Noer A, Sørensen AL, Håkelien AM, Boquest AC, Collas P. Induction of dedifferentiation, genomewide transcriptional programming, and epigeneticreprogramming by extracts of carcinoma and embryonic stem cells. *Mol Biol Cell* 2005; 16(12): 5719-35.

[14] Hansis C, Barreto G, Maltry N, Niehrs C. Nuclear reprogramming of human somatic cells by xenopus egg extract requires BRG1. *Curr Biol* 2004; 14(16): 1475-80.

[15] Bru T, Clarke C, McGrew MJ, Sang HM, Wilmut I, Blow JJ. Rapid induction for pluripotency genes after exposure of human somatic cells to mouse ES cell extracts. *Exp Cell Res* 2008; 314(14): 2634-42.

[16] Cho HJ, Lee CS, Kwon YW, Paek JS, Lee SH, Hur J, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult somatic cells by protein-based reprogramming without genetic manipulation. *Blood* 2010; 116(3): 386-95.

[17] Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 2006; 126(4): 663-76.

[18] Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, Antosiewicz-Bourget J, Frane JL, Tian S, et al. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* 2007; 318(5858): 1917-20.

[19] Liao J, Wu Z, Wang Y, Cheng L, Cui C, Gao Y, et al. Enhanced efficiency of generating induced pluripotent stem (iPS) cells from human somatic cells by a combination of six transcription factors. *Cell Res* 2008; 18(5): 600-03.

[20] Feng B, Jiang J, Kraus P, Ng JH, Heng JC, Chan YS, et al. Reprogramming of fibroblasts into induced pluripotent stem cells with orphan nuclear receptor Esrrb. *Nat Cell Biol* 2009; 11(2): 197-203.

[21] Yu J, Hu K, Smuga-Otto K, Tian S, Stewart R, Slukvin II, et al. Human induced pluripotent stem



[ Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2024-03-19 ]

[ DOR: 20.1001.1.17353165.1395.15.4.7.8 ]

cells free of vector and transgene sequences. *Science* 2009; 324(5928): 797-801.

[22] Mali P, Ye Z, Hommond HH, Yu X, Lin J, Chen G, et al. Improved efficiency and pace of generating induced pluripotent stem cells from human adult and fetal fibroblasts. *Stem Cells* 2008; 26(8): 1998-2005.

[23] Park IH, Zhao R, West JA, Yabuuchi A, Huo H, Ince TA, et al. Reprogramming of human somatic cells to pluripotency with defined factors. *Nature* 2008; 451(7175): 141-46.

[24] Zhao Y, Yin X, Qin H, Zhu F, Liu H, Yang W, et al. Two supporting factors greatly improve the efficiency of human iPSC generation. *Cell Stem Cell* 2008; 3(5): 475-9.

[25] Pfannkuche K, Fatima A, Gupta MK, Dieterich R, Hescheler J. Initial colony morphology-based selection for iPS cells derived from adult fibroblasts is substantially improved by temporary UTF1-based selection. *PLoS One* 2010; 5(3): e9580.

[26] Marson A, Foreman R, Chevalier B, Bilodeau S, Kahn M, Young R, et al. Wnt signaling promotes reprogramming of somatic cells to pluripotency. *Cell Stem Cell* 2008; 3(2): 132-5.

[27] Heng JC, Feng B, Han J, Jiang J, Kraus P, Ng JH, et al. The nuclear receptor Nr5a2 can replace Oct4 in the reprogramming of murine somatic cells to pluripotent cells. *Cell Stem Cell* 2010; 6(2): 167-74.

[28] Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, Schwartz RE, Keene CD, Ortiz-Gonzalez XR, et al. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* 2002; 418(6893): 41-9.

[29] Zaehres H, Schöler HR. Induction of pluripotency: from mouse to human. *Cell* 2007; 131(5): 834-5.

[30] Huangfu D, Osafune K, Maehr R, Guo W, Eijkelenboom A, Chen S, et al. Induction of pluripotent stem cells from primary human fibroblasts with only Oct4 and Sox2. *Nat Biotechnol* 2008; 26(11): 1269-75.

[31] Stadtfeld M, Nagaya M, Utikal J, Weir G, Hochedlinger K. Induced pluripotent stem cells generated without viral integration. *Science* 2008; 322(5903): 945-9.

[32] Blelloch R, Venere M, Yen J, Ramalho-Santos M. Generation of induced pluripotent stem cells in the absence of drug selection. *Cell Stem Cell* 2007; 1(3): 245-7.

[33] Maherali N, Ahfeldt T, Rigamonti A, Utikal J, Cowan C, Hochedlinger K. A high-efficiency system for the generation and study of human induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 2008; 3(3): 340-5.

[34] Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 2007; 131(5): 861-72.

[ Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2024-03-19 ]

[ DOR: 20.1001.1.17353165.1395.15.4.7.8 ]

[35] Aasen T, Raya A, Barrero MJ, Garreta E, Consiglio A, Gonzalez F, et al. Efficient and rapid generation of induced pluripotent stem cells from human keratinocytes. *Nat Biotechnol* 2008; 26(11): 1276-84.

[36] Li Y, Zhang Q, Yin X, Yang W, Du Y, Hou P, et al. Generation of iPSCs from mouse fibroblasts with a single gene, Oct4, and small molecules. *Cell Res* 2011; 21(1): 196-204.

[37] Nakagawa M, Koyanagi M, Tanabe K, Takahashi K, Ichisaka T, Aoi T, et al. Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts. *Nat Biotechnol* 2008; 26(1): 101-6.

[38] Wernig M, Meissner A, Foreman R, Brambrink T, Ku M, Hochedlinger K, et al. In vitro reprogramming of fibroblasts into a pluripotent ES-cell-like state. *Nature* 2007; 448(7151): 318-24.

[39] French AJ, Adams CA, Anderson LS, Kitchen JR, Hughes MR, Wood SH. Development of human cloned blastocysts following somatic cell nuclear transfer with adult fibroblasts. *Stem Cells* 2008; 26(2): 485-93.

[40] Lowry WE, Richter L, Yachechko R, Pyle A, Tchieu J, Sridharan R, et al. Generation of human induced pluripotent stem cells from dermal fibroblasts. *PNAS* 2008; 105(8): 2883-8.

[41] Chang CW, Lai YS, Pawlik KM, Liu K, Sun CW, Li C, et al. Polycistronic lentiviral vector for "hit and run" reprogramming of adult skin fibroblasts to induced pluripotent stem cells. *Stem Cells* 2009; 27(5): 1042-9.

[42] Brown ME, Rondon E, Rajesh D, Mack A, Lewis R, Feng X, et al. Derivation of induced pluripotent stem cells from human peripheral blood T lymphocytes. *PLoS One* 2010; 5(6): e11373.

[43] Jia F, Wilson KD, Sun N, Gupta DM, Huang M, Li Z, et al. A nonviral minicircle vector for deriving human iPS cells. *Nat Methods* 2010; 7(3): 197-9.

[44] Sugii S, Kida Y, Berggren WT, Evans RM. Feeder-dependent and feeder-independent iPS cell derivation from human and mouse adipose stem cells. *Nat Protoc* 2011; 6(3): 346-58.

[45] Sun N, Panetta NJ, Gupta DM, Wilson KD, Lee A, Jia F, et al. Feeder-free derivation of induced pluripotent stem cells from adult human adipose stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; 106(37): 15720-5.

[46] Sheykhhasan M, Qomi RT, Kalhor N, Mehdizadeh M, Ghiasi M. Evaluation of the ability of natural and synthetic scaffolds in providing an appropriate environment for growth and chondrogenic differentiation of adipose-derived mesenchymal stem cel. *Indian J Orthop* 2015; 49: 561-8.

[ Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2024-03-19 ]

[ DOR: 20.1001.1.17353165.1395.15.4.7.8 ]

[47] Ghiasi M, Kalhor N,Tabatabaei Qomi R, Sheykhhasan M. The effects of synthetic and natural scaffolds on viability and proliferation of adipose-derived stem cells. *Frontiers in Life Science* 2015; 9(1): 32-43.

[48] Sheykhhasan M, Tabatabaei Qomi R, Ghiasi M. Fibrin Scaffolds Designing in order to Human Adipose-derived Mesenchymal Stem Cells Differentiation to Chondrocytes in the Presence of TGF-β3. *International J Stem Cells* 2015; 8(2): 219-227.

[49] Kim JB, Zaehres H, Wu G, Gentile L, Ko K, Sebastiano V, et al. Pluripotent stem cells induced from adult neural stem cells by reprogramming with two factors. *Nature* 2008; 454(7204): 646-50.

[50] Sommer CA, Stadtfeld M, Murphy GJ, Hochedlinger K, Kotton DN, Mostoslavsky G. Induced pluripotent stem cell generation using a single lentiviral stem cell cassette. *Stem Cells* 2009; 27(3): 543-9.

[51] Carey BW, Markoulaki S, Beard C, Hanna J, Jaenisch R. Single-gene transgenic mouse strains for reprogramming adult somatic cells. *Nat Methods* 2010; 7(1): 56-9.

[52] Kaji K, Norrby K, Paca A, Mileikovsky M, Mohseni P, Woltjen K. Virus-free induction of pluripotency and subsequent excision of reprogramming factors. *Nature* 2009; 458(7239): 771-5.

[53] Woltjen K, Michael IP, Mohseni P, Desai R, Mileikovsky M, Hämäläinen R, et al. piggyBac transposition reprograms fibroblasts to induced pluripotent stem cells. *Nature* 2009; 458(7239): 766-70.

[54] Zhou H, Wu S, Joo JY, Zhu S, Han DW, Lin T, et al. Generation of induced pluripotent stem cells using recombinant proteins. *Cell Stem Cell* 2009; 4(5): 381-4.

[55] Kim D, Kim CH, Moon JI, Chung YG, Chang MY, Han BS, et al. Generation of human induced pluripotent stem cells by direct delivery of reprogramming proteins. *Cell Stem Cell* 2009; 4(6): 472-6.

[56] Zhou W, Freed CR. Adenoviral gene delivery can reprogram human fibroblasts to induced pluripotent stem cells. *Stem Cells* 2009; 27(11): 2667-74.

[57] Fusaki N, Ban H, Nishiyama A, Saeki K, Hasegawa M. Efficient induction of transgene-free human pluripotent stem cells using a vector based on Sendai virus, an RNA virus that does not integrate into the host genome. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* 2009; 85(8): 348-62.

[58] Okita K, Nakagawa M, Hyenjong H, Ichisaka T, Yamanaka S. Generation of mouse induced pluripotent stem cells without viral vectors. *Science* 2008; 322(5903): 949-53.

[ Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2024-03-19 ]

[ DOR: 20.1001.1.17353165.1395.15.4.7.8 ]

[59] Gonzalez F, Barragan Monasterio M, Tiscornia G, Montserrat Pulido N, Vassena R, Batlle Morera L, et al. Generation of mouse-induced pluripotent stem cells by transient expression of a single nonviral polycistronic vector. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; 106(22): 8918-22.

[60] Jia F, Wilson KD, Sun N, Gupta DM, Huang M, Li Z, et al. A nonviral minicircle vector for deriving human iPS cells. *Nat Methods* 2010; 7(3): 197-9.

[61] Warren L, Manos PD, Ahfeldt T, Loh YH, Li H, Lau F, et al. highly efficient reprogramming to pluripotency and directed differentiation of human cells with synthetic modified mRNA. *Cell Stem Cell* 2010; 7(5): 618-30.

[62] Chen S, Zhang Q, Wu X, Schultz PG, Ding S. Dedifferentiation of lineage-committed cells by a small molecule. *J Am Chem Soc* 2004; 126(2): 410-1.

[63] Shi Y, Desponts C, Do JT, Hahm HS, Schöler HR, Ding S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic fibroblasts by Oct4 and Klf4 with small-molecule compounds. *Cell Stem Cell* 2008; 3(5): 568-74.

[64] Shi Y, Do JT, Desponts C, Hahm HS, Schöler HR, Ding S. a combined chemical and genetic approach for the generation of induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 2008; 2(6): 525-8.

[65] Li W, Wei W, Zhu S, Zhu J, Shi Y, Lin T, et al. Generation of rat and human induced pluripotent stem cells by combining genetic reprogramming and chemical inhibitors. *Cell Stem Cell* 2009; 4(1): 16-9.

[66] Lin SL, Chang DC, Chang-Lin S, Lin CH, Wu DT, Chen DT, et al. Mir-302 reprograms human skin cancer cells into a pluripotent ES-cell-like state. *RNA* 2008; 14(10): 2115-24.

[67] Fang R, Liu K, Zhao Y, Li H, Zhu D, Du Y, et al. Generation of naive induced pluripotent stem cells from rhesus monkey fibroblasts. *Cell Stem Cell* 2014; 15(4): 488-96.

[68] Chu Z, Niu B, Zhu H, He X, Bai C, Li G, et al. PRMT5 enhances generation of induced pluripotent stem cells from dairy goat embryonic fibroblasts via down-regulation of p53. *Cell Prolif* 2015; 48(1): 29-38.

[ Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2024-03-19 ]

[ DOR: 20.1001.1.17353165.1395.15.4.7.8 ]

# Evaluation of the Production Methods of Induced Pluripotent Stem Cells: A Short Review

**M. Sheykhhasan[1], M. Ghiasi[2]**

**Received: 02/03/2016 Sent for Revision: 11/04/2016 Received Revised Manuscript: 21/05/2016 Accepted: 24/05/2016**

**Background and Objectives**: Nowadays, cell therapy is one of the most important and promising strategies in the treatment of diseases. Unique capabilities of stem cells caused them to be used in both research and treatment as a valuable resource in basic science and medical researches.

The use of stem cells has been limited due to the related ethical problems. One of the major concerns of scientists to develop and use more of this science is finding alternative methods for producing these cells. Creating induced pluripotent stem cells (IPSCs) is one of the most important methods in achieving this goal. In this regard, various methods are developing that have the ability to change the gene expression and protein profiles, which results in a change in cells morphology and function in the direction of returning to a undifferentiated status and creating stem cells. These methods include nuclear transfer, use of cell extracts and synthetic molecules, mandatory expression of specific genes, and changes in the levels of cytoplasmic. In this review article, it has been tried to review the methods in the field of the induced pluripotent stem cells production.

Literature search was performed through various combinations of keywords regarding induced pluripotent stem cells, Dedifferentiation methods, and IPSCs generation methods. Papers included in our review cover the period between 2002 to 2015.At the end of the review process, 68 articles were used in our final manuscript. In the present study, we review various methods in the IPS cells generation**.**

**Key words:** Induced pluripotent stem cells, Dedifferentiation methods, IPSCs generation methods

**Funding:** This research was funded by The Academic Center for Education, Culture and Research, Qom, Iran.

**Conflict of interest:** None declared.

**Ethical Approval:** The Ethics Committee of Academic Center for Education, Culture and Research, Qom, Iran approved the study.

**How to cite this article:** Sheykhhasan M, Ghiasi M. Evaluation of the Production Methods of Induced Pluripotent Stem Cells :A Short Review. *J Rafsanjan Univ Med Sci* 2016; 15(4): 355-76. [Farsi]

*1MSc in Biotechnology, Laboratory of Stem Cell, The Academic Center for Education, Culture and Research, Qom, Iran*
*2-MSc in Molecular and Cellular Biology , Laboratory of Stem Cell, The Academic Center for Education, Culture and Research, Qom, Iran*
*(Corresponding Author) Tel: (025) 32700155, Fax: (025) 32700154, E-mail: mahdieh.ghiasi@yahoo.com*



[ Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2024-03-19 ]

[ DOR: 20.1001.1.17353165.1395.15.4.7.8 ]