

تولید سلول‌های بنیادی پرتوان القایی (مروری اجمالی بر روش‌ها و تکنیک‌ها)

محسن شیخ حسن^{۱*}، ناصر کلهر^۱، رضا طباطبائی قمی^۱، هدی فضائلی^۱، مهدیه قیائی^۱
۱- مرکز فوق تخصصی درمان ناباروری جهاد دانشگاهی واحد قم- آزمایشگاه سلول‌های بنیادی، قم، ایران

Mahdieh.ghiasi1360@gmail.com

چکیده

امروزه سلول درمانی یکی از استراتژی‌های مهم و امیدوارکننده در زمینه درمان بیماری‌ها به شمار می‌رود. با توجه به قابلیت‌های منحصر به فرد، سلول‌های بنیادی می‌توانند به عنوان منبع ارزشمندی در تحقیقات علوم پایه و پزشکی، جهت پژوهش و درمان استفاده شوند. در حالی که استفاده از سلول‌های بنیادی با توجه به مشکلات اخلاقی مربوط به آن کاربرد این سلول‌ها را محدود کرده است. یکی از دغدغه‌های مهم دانشمندان برای توسعه و استفاده بیشتر از این علم، در نتیجه نیاز به یافتن یک جایگزین جهت تولید این سلول‌ها، به شمار می‌رود. ایجاد سلول‌های بنیادی پرتوان القایی (Induced pluripotent stem cell) 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. امروزه پیشرفت‌هایی در روش‌های غیرادغام شونده در ژنوم سلول‌ها وجود دارد که با این وجود در مورد افزایش کارایی این روش‌ها پژوهش‌های زیادی در حال انجام است. در این مقاله مروری، سعی شده است که تکنیک‌ها، مزیت‌ها و فرصت‌های پیش رو در زمینه تولید سلول‌های بنیادی پرتوان القایی مورد بررسی قرار گیرد.

کلمات کلیدی: سلول‌های بنیادی پرتوان القایی، iPS، تکنیک‌های تمایززدایی

مقدمه

تولید کننده انسولین، پانکراس و غیره تبدیل شوند. به این قابلیت پرتوانی اطلاق می‌شود. سلول‌های پرتوان علاوه بر توانایی تکوین به ۲ لایه جفتی، قادرند به سه لایه زاینده (اندودرم، مزودرم و اکتودرم) نیز تکوین یابند (۱). بر اساس این حقیقت که در پستانداران

سلول‌های بنیادی قادر به ایجاد هر نوع سلول در بدن هستند. آن‌ها می‌توانند تحت تاثیر عوامل رشد مختلف در محیط کشت به سلول‌هایی با عملکردهای اختصاصی مانند سلول‌های ماهیچه قلب یا سلول‌های

عالی دستیابی به قابلیت همه توانی مشکل است (۲)، جهت حل این مشکل و جایگزینی آن، تمایز یابی به سمت پرتوانی و چند توانی در حال مطالعه می باشد. بطوری که قسمت عمده تلاش های علمی جهت نائل شدن به این هدف تمرکز یافته اند. سلول های بنیادی چند توان آن هایی هستند که قادرند به رده های چند گانه اما محدود تمایز پیدا کنند. سلول های بنیادی پرتوان را می توان به عنوان یک حالت ژنومی در نظر گرفت که در طی تکوین ایجاد می شود، بطوری که ای ها می توانند به هر کدام از ۳ نوع لایه در ۳ رده زاینده تبدیل شوند (۳ و ۱). این سلول ها مسئول حفظ هموستازی بافتی هستند، بطوری که سلول های آسیب دیده و یا پیر را با سلول های جدید جایگزین می کنند (۴). در طی سال های اخیر، سلول های بنیادی پرتوان جنینی از توده سلولی داخلی جنین انسان مشتق شده اند (۲). با این حال، استفاده از این روش در اهداف تحقیقاتی محدود بوده و به لحاظ اجتماعی و اخلاقی آن چنان پذیرفته شده نیست. به همین دلیل، ضرورت داشتن منابع متفاوتی از سلول های بنیادی که بتوان از آن ها در مطالعات تشخیصی یا درمانی استفاده کرد، یک زمینه مطالعاتی وسیع و جدیدی را ایجاد می کند.

القای پرتوانی در سلول های تمایز یافته

این موضوع به معنی عقب گرد در حوزه تکوین به منظور کسب سلول های بنیادی از سلول هایی است که به صورت کامل یا جزئی تمایز یافته اند. در این زمینه

نتایج دلگرم کننده ای به دست آمده است. تاکنون، سلول های بنیادی پرتوان القایی (iPS) از سلول های سوماتیک انسان و موش مشتق شده اند. اگر چه این سلول ها به خوبی در شرایط آزمایشگاهی تکوین می یابند، با این حال آزمایشاتی که در شرایط حیاتی صورت می پذیرند همیشه نتایج مورد قبول را ارائه نمی دهند، بطوری که سلول های iPS را می توان به اندام های هدف مختلف پیوند زد، اما قابلیت تکثیر و تمایز در برخی از قسمت ها و نه همه قسمت های اندام را ایجاد می کنند (۱). علاوه بر این، بر اساس توانایی آن ها در ایجاد هر کدام از سلول های لایه زاینده، پیوند این سلول ها می تواند با میزان بالای ایجاد تومور در اندام ها همراه باشد. یک تکوین موفق که بر اساس پروسه کارآمد و مطمئن تمایز زدایی سلول اتفاق می افتد، راهی را ایجاد می کند که می تواند جایگزین پیوندهای ناموفق شده و امید به زندگی را برای هزاران فرد در سراسر جهان افزایش دهد. هدف این مقاله بازنگری کلی موضوع تولید سلول های بنیادی پرتوان القایی است که مهمترین و امیدبخش ترین روش های تمایز زدایی مورد استفاده در گروه های مختلف تحقیقی را در سراسر جهان تشکیل می دهد. امروزه در حیوانات نیز از سلول های تمایز یافته مختلف برای تولید سلول های بنیادی پرتوان القایی استفاده شده است که به صورت خلاصه به همراه کلیات روش ها در جدول شماره ۱ آمده است.

"شیخ حسن و همکاران، تولید سلول‌های بنیادی پرتوان القایی"

جدول ۱- تولید سلول‌های بنیادی پرتوان القایی در حیوانات

نام حیوان	نوع سلول مورد استفاده	ژن‌های فاکتورهای پرتوانی	روش مورد استفاده	منبع
خوک	سلول‌های فیبروبلاست	Sox2, Klf4, Oct4, C-myc موشی	سیستم بیانی رتروویروسی	Esteban و همکاران (۲۰۰۹)
خوک	سلول‌های جنینی فیبروبلاست	Sox2, Klf4, Oct4, C-myc انسانی	سیستم بیانی رتروویروسی	Ezaschi و همکاران (۲۰۰۹)
خوک	سلول بالغ خوک	Sox2, Klf4, Oct4, C-myc موشی	سیستم بیانی لتی ویروسی القا شونده با دارو(داکسی سیکلین)	Wu و همکاران (۲۰۰۹)
خوک	سلول‌های مزانشیمی خوک	انسانی- Sox2, Klf4, Oct4, C-myc, Nanog, Line28	سیستم بیانی رتروویروسی	West و همکاران (۲۰۱۰)
گاو	سلول‌های جنینی گوساله فیبروبلاست	گاو- Sox2, Klf4, Oct4, C-myc, Nanog, Line28	سیستم بیانی رتروویروسی	Han و همکاران (۲۰۱۱)
گوسفند	سلول‌های فیبروبلاست	انسانی Sox2, Klf4, Oct4, C-myc	سیستم بیانی لتی ویروسی القا شونده با آنتی یوتیک تتراسایکلین	Li و همکاران (۲۰۱۱)
گوسفند	سلول‌های گوسفند سوماتیک	انسانی- Sox2, Klf4, Oct4, C-myc, Nanog, Line28, SV40 hTERT و large T	سیستم بیانی لتی ویروسی القا شونده با دارو	Bao و همکاران (۲۰۱۱)
بز	سلول‌های فیبروبلاست گوش	انسانی Sox2, Klf4, Oct4, C-myc	سیستم بیانی لتی ویروسی القا شونده با دارو(داکسی سیکلین)	Ren و همکاران (۲۰۱۱)
اسب	سلول‌های فیبروبلاست	انسانی Sox2, Klf4, Oct4, C-myc	سیستم بیانی مبتنی بر ترانسپوزون Piggy Bac	Nagy و همکاران (۲۰۱۱)
سگ	سلول‌های بالغ فیبروبلاست	انسانی Sox2, Klf4, Oct4, C-myc	سیستم بیانی رتروویروسی	Luo و همکاران (۲۰۱۱)
موش	سلول‌های گوش سلول‌های مزانشیمی بافت چربی	موشی Sox2, Klf4, Oct4, C-myc	سیستم بیانی غیرویروسی القا شونده	Merkel و همکاران (۲۰۱۳)

روش‌های القای پرتوانی: پیشرفت هستند. در حالی که Evans و Kauffman نزدیک به ۱۰ سال است که پروتکل‌های پژوهشی مرتبط با این موضوع به صورت گسترده‌ای در حال اولین مطالعات را در مورد تولید سلول‌های بنیادی جنینی حدود ۳۰ سال پیش آغاز کردند (۴). رده‌های

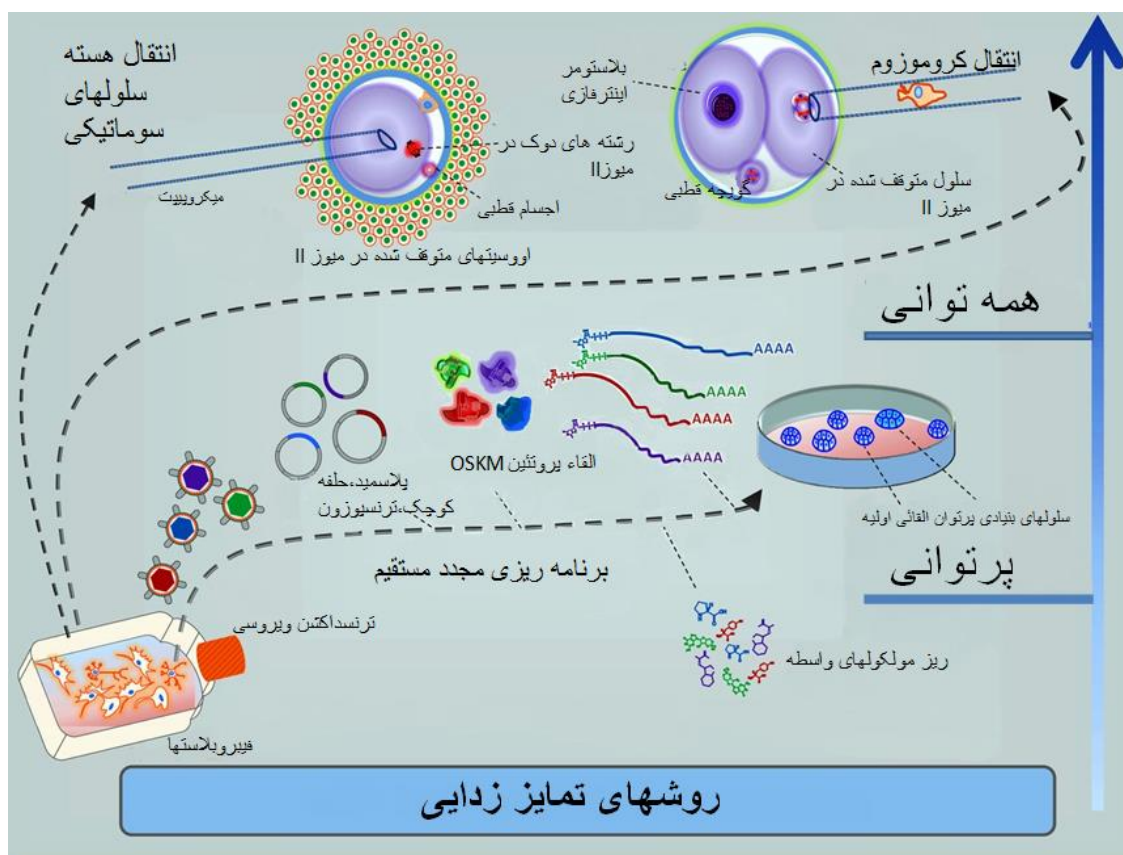
متفاوت سلول انسان، رت و موش جهت آنالیز ژن‌های دخیل در فرآیند تمایز و حفظ حالت پرتوانی مورد استفاده قرار گرفته‌اند. اطلاعات اندکی در رابطه با مکانیسم‌های برنامه‌ریزی مجدد (Reprogramming) یا تمایززدایی وجود دارد، ولی به صورت قاطع بازآرایی کروماتین، یک گام کلیدی در این فرآیند است. پس از تکمیل شدن فرایند تمایززدایی، مسیرهای سیگنال‌دهی LIF، Wnt و BMP که گروهی از مسیرهای انتقال سیگنال پروتئینی هستند و سیگنال‌ها را از طریق گیرنده‌های سطحی سلول از بیرون سلول به داخل آن هدایت می‌کنند، برای حفظ سلول‌های بنیادی در فرایند خودنوزایی درگیر می‌شوند (۷). فرآیند تمایززدایی می‌تواند در مراحل مختلف ارزیابی شود. طی این فرایند، بیان ژن‌های سلول مورد نظر معکوس شده 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 تمایز یافته می‌باشد. در این فرآیند، مورفولوژی سلول‌ها نیز دستخوش

تغییراتی قرار می‌گیرد که طی آن سلول‌های تمایزنیافته، کوچکتر از سلول‌های تمایز یافته به نظر رسیده و از لحاظ کاربوپلاسم و اندامک‌ها نیز به‌ترتیب میزان بالاتر و میزان کمتری را در مقایسه با سلول‌های تمایز یافته دارا می‌باشند. در سطوح عملکردی، سلول‌های تمایزنیافته توانایی بیشتری جهت تبدیل شدن به انواع وسیعی از سلول‌ها، نسبت به سلول‌های تمایز یافته 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 تضمین شده مانند آنچه که در شرایط حیاتی رخ می‌دهد، ندارند.

روش‌های تمایززدایی

روش‌های متفاوتی جهت انجام برنامه‌ریزی مجدد تاکنون شناسایی شده‌اند. (شکل ۱ و جدول ۲). در این زمینه تحقیقات زیادی در مورد تعیین کارآمدترین رده سلولی در رابطه با از بین رفتن تمایز انجام گرفته است.

"شیخ حسن و همکاران، تولید سلول‌های بنیادی پرتوان القایی"



شکل ۱- روش های تمایز زدایی جهت تولید سلول های بنیادی پرتوان القایی

جدول ۲- روش های تولید سلول های بنیادی پرتوان القایی

روش	تکنیک	مزایا	معایب	کارایی
انتقال هسته سلول سوماتیک	هسته سلول سوماتیک با یک اوسیت بدون هسته امتزاج داده می شود	رده های سولی انسان می توانند به همراه امتزاج همولوگ ایجاد شوند	نتایج برنامه ریزی اپی ژنتیکی مجدد جهت پیش بینی، ناکارآمد می باشد	-
عصاره سلولی	به منظور بیان پروفایل های سلول های بنیادی جنینی، سلول های تمایز یافته با آن- ها مخلوط و کشت می شوند	این روش علاوه بر این که امکان آنالیزهای بیوشیمیایی و کینتیکی برنامه ریزی مجدد را فراهم می سازد، امکان استفاده از نتایج حاصله جهت شناسایی فاکتورهای دخیل در برنامه- ریزی را نیز مهیا می کند	در صورتی که پروفایل بیانی پروتئین سلول هدف با تولید پروتئین عصاره سلولی مرتبط باشد، باعث ایجاد مشکل می شود	-
بیان اجباری فاکتورهای مشخص	انتقال و بیان ترکیبی از سری فاکتورهای ایجاد کننده پرتوانی از جمله Oct4, Sox2 و ... در سلول های بنیادی جنینی	روشی است که بیشترین مطالعات با استفاده از آن صورت پذیرفته و دارای بالاترین کارایی در میان روش های مورد استفاده در تولید سلول های بنیادی پرتوان القایی می باشد	استفاده از رتروویروس و آدنوویروس زمانی که آن ها به درون ژنوم میزبان تلفیق شوند، می تواند به فعال سازی مجدد ژن های سرطانی منجر شود	کارایی این روش بسته به رده سلولی بین ۰/۰۰۱ تا ۴/۴٪ محاسبه شده است.
مولکول های سنتتیک	ترکیبات دارای وزن مولکولی پایین، به عنوان معرف برنامه ریزی مجدد بکار می روند	به عنوان ابزاری مناسب جهت کنترل سرنوشت سلول های بنیادی و جهت درک بهتر فرایندهای تکاملی به کار می رود	ترکیب منفرد از مولکول های سنتتیک قابلیت تولید سلول- های بنیادی پرتوان القایی را ندارد	استفاده از ترکیبات با وزن مولکولی پایین، امکان افزایش ۲/۶ تا ۱۰۰ برابر کارایی برنامه ریزی مجدد را زمانی که با بیان اجباری فاکتورهای مشخص همراه شوند میسر می سازد
میکرو RNA	هدف این روش تغییر پروفایل ساخت پروتئین سلولی با استفاده از میکرو RNA می باشد	هنگامی که با بیان اجباری ژن های مشخص همراه شوند، mir290 می تواند جایگزین c-Myc شود	برهمکنش های میکرو RNA ها و فاکتورهای نسخ برداری به خوبی شناخته نشده است	-

انتقال هسته‌ای

انتقال هسته سلول‌های سوماتیک، فرآیندی است که طی آن هسته یک سلول سوماتیک به یک اووسیت بالغ فاقد هسته انتقال می‌یابد. این انتقال، یک بازآرایی ناکامل اپی‌ژنتیکی در هسته‌های سلول سوماتیک ایجاد می‌کند که سلول را بدون برنامه‌ریزی مجدد که به طور طبیعی طی تکوین اتفاق می‌افتد، به سمت تشکیل حالت پرتوانی سوق می‌دهد (۹ و ۱۰). توانایی اووسیت جهت برنامه‌ریزی مجدد، به نوع سلول‌های اهداکننده بستگی دارد. هسته سلول‌هایی که تمایز کمتری پیدا کرده‌اند، در مقایسه با سلول‌های تمایز یافته‌تر، تکوین بهتری را نشان می‌دهند. با توجه به این موضوع که برنامه‌ریزی مجدد در طی فرآیند کلونینگ، به صورت تصادفی اتفاق می‌افتد، بنابراین بسیاری از نقص‌ها زمانی پدیدار می‌شوند که فرآیند به صورت کامل انجام نپذیرد. در این میان نقصی که در 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 فعال‌سازی کروموزوم X تاثیرگذار باشد (۱۰). تنها هسته‌هایی که تحت برنامه‌ریزی مجدد اپی‌ژنتیکی قرار گرفته‌اند، قادر به تولید سلول‌های بنیادی جنینی به روش SCNT هستند (۹).

عصاره‌های سلولی

این تکنیک شامل استفاده از عصاره سلول تمایز یافته، سلول‌های بنیادی پرتوان و یا سلول‌های بنیادی جنینی است (۱۱). نتایج حاصل از این تکنیک بسیار جالب می‌باشند، بطوری‌که امکان خالص‌سازی ترکیبات پروتئینی با قابلیت برنامه‌ریزی مجدد را فراهم می‌کنند

(۱۲). آزمایشاتی که با استفاده از عصاره تخم زنبوپوس انجام گرفته، نشان دادند که کارایی بازآرایی بخش کروماتینی هسته تمایز یافته بستگی به در معرض قرار گرفتن با عصاره تخم میتوزی دارد که همانندسازی DNA جنینی را تسهیل می‌کند (۱۲ و ۱۴). Bru و همکاران (۱۵)، ژن‌های Oct4، Sox2، Klf4 و cMyc (OSKM) را پس از قرار دادن فیروبلاست‌ها در معرض عصاره سلول‌های بنیادی جنینی به درون ژنوم فیروبلاست انتقال دادند. Freberg و همکاران (۱۱)، 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. فیروبلاست‌هایی که در معرض عصاره سلول‌های بنیادی جنینی موش قرار گرفتند، نشان دادند که یک القای 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، نتیجه بیان‌گذرای ژن‌هایی است که در عصاره وجود دارند یا خیر (۱۱). از طرف دیگر مشخص نیست که این سلول‌ها بطور کامل از لحاظ رونویسی و ظرفیت تمایزی قادر به ایجاد ۳ لایه زاینده پرتوان هستند یا خیر. بنابراین Cho و همکارانش (۱۶) با تیمار سلول‌های سوماتیک ابتدایی

Esrrb، (۱۹و۱۸) LIN28، (۳) Stat3، (۱۸و۹) (۲۰) Sv40LT، (۲۳-۲۱)، UTF-1 (۲۵و۲۴)، P53، (۲۶) WNT3a، (۲۳) hTERT، (۲۴) SiRNA Nr5a1 (۲۷) در آزمایش‌های مختلف، مورد استفاده قرار گرفته‌اند که ثابت شده برخی از آن‌ها کارآمدی برنامه‌ریزی مجدد را افزایش می‌دهند، یا این که قادرند جایگزین یکی از ژن‌های OSKM شوند. برای انتقال این ژن‌ها از روش‌های الحاقی و غیرالحاقی استفاده شده است که در جدول شماره ۳ به این روش‌ها و مزایا و معایب آن‌ها به صورت کلی اشاره شده است.

با یک عصاره پروتئینی مشتق شده از سلول‌های بنیادی جنینی توانستند پروتئین‌های سلول‌های IPS 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.

بیان اجباری ژن‌های مشخص

انتقال ژن‌های Oct4، Sox2، Klf4 و cMyc (OSKM) به سلول‌های سوماتیک و جنینی، باعث ایجاد خصوصیات شبیه به سلول‌های بنیادی می‌شوند (۱۷و۹). ترکیبات متفاوت ژنی از جمله Nanog

جدول ۳- روش‌های تلفیقی و غیرتلفیقی در تولید سلول‌های بنیادی پرتوان القایی

معایب	مزایا	روش
الحاق به ژنوم	کارا و قابل تکنیر	رتروویروس‌ها
احتمال الحاق به ژنوم و کارایی متوسط	عاری از وکتور	لنتی ویروس‌ها
کند و کارایی پایین و احتمال الحاق ژنومی	حذف وکتور احتمالی	RNA خطی
کند و غیرکارا	هیچ الحاق ژنومی وجود ندارد	ترانسپوزون PiggyBac
رقت دوز ژن‌ها و ناکارآمدی و احتمال الحاق به ژنوم	هیچ الحاق ژنومی وجود ندارد	آدنوویروس
ناکارآمدی و کندی	عاری از ترانسژن	پروتئین‌ها و مولکول‌های کوچک
دوز بالای ژن‌های پیش سرطان‌زا و نیاز به عوامل ترانسفکشن چندگانه	عاری از ترانسژن و کارا	mRNA
معمولاً در ترکیب با دیگر روش‌ها ایجاد موفقیت می‌نماید	عاری از ترانسژن	miRNA

روش‌های الحاقی

مشکل اصلی این روش استفاده از ناقل‌های رتروویروسی، لنتی ویروسی یا آدنوویروسی برای وارد کردن ژن‌های تمایززا می‌باشد. رتروویروس‌ها زمانی که به طور کامل به داخل ژنوم سلول راه می‌یابند

می‌توانند سبب فعال‌سازی مجدد ژن‌های سرطانی شوند (۲۸و۲۹). از طرف دیگر وکتورهای آدنوویروسی توانایی راهیابی و تلفیق به داخل ژنوم سلول میزبان را به میزان بسیار پایین‌تری دارند که این مسئله، دلیل احتمالی میزان پایین کارایی گزارش شده در رابطه با

آن‌ها می‌باشد (۳۰ و ۳۱). راه اندازهای القاپذیر و ثابت لنتی‌ویروسی، همانند وکتورهای لنتی‌ویروسی با قابلیت حذف از ژنوم و القاپذیری با آنتی‌بیوتیک داکسی‌سایکلین مورد استفاده قرار می‌گیرند (۱۸ و ۳۲ و ۳۳). بدون شک کاری که در سال ۲۰۰۶ به‌وسیله Takashi و همکاران گزارش شد که طی آن سلول‌های سوماتیک موشی را با استفاده از OSKM به سلول‌های IPS تبدیل کردند، جهشی بزرگ در علم سلول‌های بنیادی تلقی می‌شود (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 فرآیند تمایززدایی کار می‌کنند. با این وجود اگرچه این روش‌ها تعداد ژن‌های دخیل در این فرآیند را کاهش می‌دهند، اما از طرفی نیاز به این‌که سلول در مراحل ابتدایی تری از تکوین قرار داشته باشد را افزایش می‌دهند (۳۰ و ۳۵ و ۳۸). پس مساله نهایی که باقی می‌ماند، یافتن تعداد حداقل ژن‌های لازم که بتوانند سلول‌های سوماتیک را به مرحله پرتوانی برسانند، می‌باشد. تاکنون در این تحقیقات از سلول‌های مختلفی شامل سلول‌های کبدی موشی (۱۷ و ۲۸ و ۳۴)، فیبروبلاست‌های جنینی یا بالغ موشی (۳۷ و ۳۹) یا فیبروبلاست‌های جنینی و بالغ انسانی (۲۳ و ۳۰ و ۳۱ و ۳۳ و ۳۷ و ۳۸ و ۴۰ و ۴۱)، کراتینوسیت‌ها (۳۳ و ۳۵)، لنفوسیت‌ها (۴۲)، هپاتوسیت‌ها (۱۳)، بافت چربی (۴۳ و ۴۵)، سلول‌های مغز (۴۶)، طحال (۲۸)، پیش‌سازهای عصبی، غدد آدرنال، سلول‌های عضلانی، سلول‌های اپیتلیوم روده، سلول‌های بنیادی مزانشیمی، سلول‌های استرومای مزانشیمی، سلول‌های آمیوبی، سلول‌های بندناف، سلول‌های بنیادی پالپ

دندان و سلول‌های بتای پانکراس برای این آزمایش‌ها استفاده شده است. بهترین نتیجه با سلول‌های چربی و کراتینوسیت‌ها به دست آمد، بطوری‌که کارآمدی تمایززدایی بیش از ۰٫۱ درصد 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 همکاران (۴۷) ناقل لنتی‌ویروسی را با استفاده از پپتید 2A و تکنولوژی جایگاه داخلی ورودی ریبوزوم و چهار فاکتور رونویسی (OSKM) طراحی کردند که کارایی آن ۱۰ برابر پژوهش‌های قبلی بود و میزان کارایی آن به بیش از ۰٫۵ درصد 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 تک ژنی است (۴۱ و ۴۸). استفاده از سیستم‌های نوترکیب همولوگ که از جایگاه‌های LoxP برخوردار می‌باشند گام‌های ابتدایی به سمت روش‌های غیر الحاق شونده را نمایان می‌کند. این روش‌ها خطرات انکوژنیک را با حذف ترانس‌ژن رفع می‌کنند. Kaji و همکاران (۴۹) 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 درصد بود.

روش‌های غیر تلفیقی (Non-integrative) در ژنوم

سلول‌های بنیادی پرتوان القایی، برای نخستین بار توسط انتقال چهار فاکتور مشخص به وسیله ناقلین رتروویروسی تولید شدند که روشی موثر و کارآمد می‌باشد. با این وجود، می‌بایستی جهت کاربردهای بالینی حداقل امکان 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 می‌باشند. Soldner و همکاران با استفاده از ناقل لتی ویروسی که توانایی آلوده کردن سلول‌هایی که در حال تقسیم و تکثیر نباشند را دارا می‌باشند و حاوی توالی loxP در ناحیه تکراری انتهایی (LTR) ۳' بود، جهت انتقال فاکتورهای تمایزدایی به سلول استفاده کردند. در این مطالعه، پس از اتمام فرآیند تمایزدایی در سلول، توالی loxP که ناحیه ترانسژن در میان آن قرار داشت توسط آنزیم Cre recombinase شناسایی و حذف شد. پس از ترکیب و رفع توالی‌های ترانسژن، سلول‌های بنیادی پرتوان القایی حالت پرتوانی خود را حفظ کردند. چهار روش جهت غلبه بر خطرات حاصل از روش تلفیقی شناسایی شده‌اند که شامل ویروس‌های غیرادغام شونده به ژنوم و پلاسمیدهای اپیزومی و سیستم‌های تحویل RNA و پروتئین می‌باشند (۵۱ و ۵۲). در روش‌های غیرتلفیقی از آدنوویروس ایجاد کننده نقص در همانندسازی یا وکتورهای ویروسی سندای F-deficient استفاده می‌کنند. روش‌های غیرتلفیقی اپیزومال غیرهماند ساز (۵۵ و ۵۷) یا همانند ساز (۲۱) امکان تولید سلول‌های بنیادی پرتوان القایی فاقد پلاسمید را تضمین نمی‌کند.

بطوری‌که با استفاده از اپیزومال غیرهماند ساز و همانند ساز، تنها ۳۳ و ۸ درصد از کل سلول‌های القا شده هیچ اثری از تلفیق پلاسمید را نشان ندادند. همچنین پلاسمیدهای دیگر مورد استفاده پلاسمیدهای مبتنی بر ویروس ابشتین-بار بوده که پایداری آن‌ها بیشتر بوده و می‌توانند جهت بیان عوامل برنامه‌ریزی شده مجدد برای تولید سلول‌های بنیادی پرتوان القایی مورد استفاده قرار گیرند. مساله 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 این تکنیک توسط jia و همکاران پیشنهاد شد که در آن با استفاده از ناقل‌های مینی‌حلقوی غیرالحاقی به ژنوم که اندازه آن‌ها در مقایسه با اپیزوم کوچک‌تر می‌باشد، میزان کارایی در تولید سلول‌های بنیادی پرتوان القایی که در مدت ۱۴-۱۶ روز ایجاد شدند افزایش چشمگیری یافت (۵۷). به‌منظور حذف کامل وکتورهای ویروسی یا پلاسمیدی، یک روش پیشنهادی تبدیل RNA بود که کارایی این روش با استفاده از فیبروبلاست به بیش از ۴/۴ درصد رسید (۵۸). 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 خطرات سرطان‌زایی را افزایش دهد. سلول‌های بدست آمده طی این روش به عنوان pIPS (partially induced pluripotent stem cells) شناخته می‌شود. در این روش، پروتئین‌های نو ترکیب با پپتیدهای واسطه‌گر انتقال در حضور (۵۱) یا غیاب والپوریک اسید (vpa) تولید می‌شوند (۵۲). اما این روش از لحاظ کینتیکی کند بوده و کارایی پایینی دارد.

"شیخ حسن و همکاران، تولید سلول‌های بنیادی پرتوان القایی"

علاوه بر این تولید پروتئین و خالص‌سازی آن یک فرآیند پیچیده است که قابلیت تجدید آزمایشگاهی آن را تضمین نمی‌کند.

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 سوماتیک با کاربردهای حیاتی باشد. استفاده از ترکیب کوچکی به نام Reversia قابلیت القای برنامه‌ریزی مجدد سلولی در میوبلاست‌های C2C12 را نشان می‌دهد که سلول‌هایی با قابلیت تمایزی استخوان‌ساز (osteogenic) و چربی‌ساز (adipogenic) را ایجاد می‌کند (۹ و ۵۹). در سال‌های اخیر به طور عمده‌ای ممانعت کننده‌های DNA متیل ترانسفراز و هیستون داستیلاز (HDAC) جهت افزایش کارایی برنامه‌ریزی مجدد با استفاده از بیان اجباری ژن‌های مشخص و یا تکنیک‌های انتقال هسته سلول‌های سوماتیک به کار می‌روند. رایج‌ترین ممانعت کننده‌های HDAC عبارتند از suberoylanide hidroxic acid (SAHA)، trichostatin A (TSA) و والپروئیک اسید می باشند. حتی معروف‌ترین ممانعت کننده DNA متیل ترانسفراز که 5' Azacitidine, RG108 و BIX-01294 هستند، به منظور یافتن میزان کارایی‌شان هنوز مورد تحقیق می‌باشند (۶۰ و ۶۱). همچنین استروئید گلوکوکورتیکوئید دگزامتازون، ممانعت کننده TGF- β L-type calcium agonist (۶۲) و A-83-01

BayK8644 (۶۰) در حال مطالعه می‌باشند. مهمترین این ترکیبات و عملکرد آن‌ها در جدول شماره ۴ آمده است. در آزمایشاتی که بیان اجباری ژن‌های Oct4, Sox2, Klf4 و cMyc درون سلول‌های Mouse embryonic fibroblast (MEF) انجام شد، با استفاده از 5' azaC و دگزامتازون، کارایی برنامه‌ریزی مجدد به ترتیب ۱۰ و ۲,۶ برابر افزایش یافت. از طرف دیگر زمانی که از vpa استفاده شد، کارایی آزمایش را ۱۰۰ برابر بیشتر از آزمایش‌های کنترل در حالت وابسته به دوز رسانید. ممکن است vpa یک مرحله کنترل کننده‌ی سرعت را در برنامه‌ریزی مجدد کنترل کند، اما به تنهایی برای برنامه‌ریزی مجدد MEF کافی نیست (۳۰). هنگامی که ۳ ژن مورد استفاده قرار می‌گیرند، 5' azaC برنامه‌ریزی مجدد را ۳ برابر بهبود می‌بخشد، در حالی که vpa بیش از ۵۰ برابر آن را بهبود می‌بخشد. زمانی که تکنیک Knock Out مورد استفاده قرار می‌گیرد، RG108 کارایی را نزدیک به ۳۰ برابر و BayK8644 آن را ۱۰ برابر افزایش می‌دهد. اخیراً Li و همکاران (۳۶) قادر به ایجاد سلول‌های IPS از فیبروبلاست جنینی و بالغ موشی در حضور Oct4 به تنهایی و ترکیبی از مولکول‌های مصنوعی شدند. ترکیبات با وزن مولکولی پایین، برای کنترل سرنوشت سلول‌های بنیادی و نیز برای درک بیشتر فرآیندهای تکوینی می‌توانند مفید باشند (۷). اما این سوال همچنان باقی می‌ماند که آیا روزی خواهد رسید که برنامه‌ریزی مجدد سلول با استفاده از یک روش شیمیایی خالص انجام شود؟

جدول ۴- 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 TGFβ
CHIR99021	مهارکننده GSK3
RepSox	مهارکننده Tgfr1 کیناز
PS48	فعال کننده PDK1
Vitamin C	ماده غذایی ضروری

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 که چگونه فاکتورهای رونویسی و miRNA با هم میانکنش دارند. اعتقاد بر این است که miRNA، حالت پایدار فیزیولوژیکی سلول‌های تمایز یافته را حفظ می‌کند تا این که تمایز سلول را راه‌اندازی کنند. پاسخ سلولی به فاکتورهای خارجی که بیان ژن را برنامه‌ریزی مجدد می‌کنند، با تغییر بارگذاری آنها می‌تواند بهبود یابد، که سبب سازگاری بیشتر سلول برای کسب حالت پرتوانی می‌شود (۹). آزمایشاتی با استفاده از میکرو RNA mir-302 در رده‌های سلول‌های سرطانی PC3 و Colo انجام شده است.

بطوری که سلول‌های بنیادی پرتوان القایی توسط miRNA که تمایز در آنها از بین رفته بود، قادر به تمایز به سلول‌های پیش‌ساز شبه نرونی، غضروفی، فیبروبلاستی و اسپرماتوگونی بودند (۶۳). مجموعه mir-290 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 پیش برد تمایززدایی سلول‌های بنیادی شود. RNAهای کوچک می‌توانند جایگزین فاکتورهای اضافی شوند که در حقیقت جایگزین استفاده از عناصر DNA انتقال یافته را فراهم می‌سازند (۶۴). بیان افزایش یافته miRNA-145 از خودنوازی سلول‌های بنیادی جنینی انسان جلوگیری می‌کند، همچنین بیان ژن‌های پرتوانی را سرکوب کرده و تمایز

"شیخ حسن و همکاران، تولید سلول‌های بنیادی پرتوان القایی"

مجدد رده سلولی را القا می‌کند (۶۵). اگر بازدهی آلودگی با miRNAها افزایش یابد و همچنین یک مجموعه استاندارد از miRNAهای دخیل در فرآیند برنامه‌ریزی مجدد شناسایی شوند، این روش می‌تواند روش امیدوار کننده‌ای برای تولید سلول‌های بنیادی پرتوان القایی محسوب شود.

چشم اندازهای آینده

روش‌های بسیار زیادی تاکنون شناسایی شده‌اند، اما تا شناسایی بهترین روش هنوز نیاز به تحقیقات بیشتری می‌باشد. بدون شک، قسمت عمده تلاش‌ها به فرآیندهای سریعتر، مطمئن‌تر و کارآمدتر 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 القایی متمرکز شده‌اند (۶۶). با این‌که استفاده از پروتئین نو ترکیب مطمئن‌تر است، اما نتایجی که تاکنون بدست آمده امیدوارکننده نیستند. بطوری‌که این روش غیرکارآمد با سرعت پایین عمل می‌کند (۵۱ و ۵۲). با این‌که ثابت شده 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 القایی را بدون استفاده از ژن‌ها تولید کنند. استفاده از miRNA هنوز یک پیشنهاد امیدوارکننده است. زمانی‌که درک دقیق‌تری از این نوع RNA و نقش آن در فرایند تمایززدایی بدست بیاید، مشکل روش غیرتلفیقی با

استفاده از این تکنیک حل می‌شود. کارایی و مشکلات مربوط به روش غیرتلفیقی به عنوان عمده‌ترین مشکلات مطرح است. خصوصیات سلول‌های بنیادی پرتوان القایی، همچون بازآرایی اپیژنتیک، قابلیت پایداری، خصوصیت رونویسی و الحاق ژنومی، نبایستی دست کم گرفته شوند و باید پتانسیل تومورزایی آن‌ها مورد آنالیز قرار گیرد. پس می‌توان گفت که IPS، در واقع سلول‌های بنیادی جنینی را شبیه‌سازی می‌کند و می‌تواند به عنوان جایگزین آن‌ها، برای استفاده در سلول درمانی به کار رود (۶۷ و ۶۹).

نتیجه‌گیری

برای رسیدن به سطح کاربردی و کلینیکی این تکنیک مشکلات زیادی باقی مانده‌اند که حل نشده‌اند. امیدوار کننده‌ترین روش، بیان اجباری ژن‌ها است. عمده‌ترین قسمت تلاش‌های تحقیقاتی بر این موضوع تمرکز یافته‌اند. بزرگترین مشکل استفاده از وکتورهای ویروسی این است که آن‌ها قادر به فعال‌سازی مسیرهای انکوژنیک هستند و از طرفی روش‌های غیر تلفیقی با تمامی مزایای خود هنوز قادر نیستند نتایج کارایی را ارائه دهند. جستجوی راه‌حل‌های اجرائی اخلاقی و اقتصادی برای مشکلات زیست درمان جهانی که مرتبط با ترمیم بافت هستند، برجسته‌ترین مفهومی است که تلاش‌های گروه‌های تحقیقاتی را در سراسر جهان به این شبکه معطوف می‌دارد. تکنیک‌های گوناگونی شناخته شده و نتایج نویدبخشی به دست آمده‌اند. بر اساس این نتایج، پژوهش‌ها باید دوباره تنظیم شوند. بیان اجباری ژن‌های مشخص و مولکول‌های مصنوعی، بالاترین پتانسیل را در این زمینه دارا می‌باشند، اما لازم است که آن‌ها را باز کنیم

بگیرند و می‌تواند کارآمدی کشف دارو را افزایش دهد. این روش یک ابزار برای آزمایش‌های سم شناسی بوده و غربالگری بیمار و درمان‌های ترمیمی را ممکن می‌سازد و همچنین از لحاظ اقتصادی مقرون به صرفه‌تر است. دانشمندان در مقابل یک راه حل بسیار چالش برانگیز قرار دارند. در واقع، تمام تلاش‌های خلاصه‌بندی شده، در نهایت یک رویکرد کلینیکی را حاصل می‌نماید که می‌تواند مسیر درمان بیماری‌ها را تغییر دهد.

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، مثل درک بهتر بازآرایی الگوی داخلی سلول که می‌تواند پاسخ بسیاری از سوالات موجود باشد. این تکنیک باعث می‌شود که رده‌های خاصی از سلول‌های بنیادی یک بیمار، برای مطالعه مکانیسم‌های بیماری متفاوت مورد استفاده قرار

References

فهرست منابع

- 1- Smith, A. (2006). A glossary for stem-cell biology. *Nature*, 441(7097), 1060.
- 2- Pan, G. J., Chang, Z. Y., Schöler, H. R., & Duanqing, P. E. I. (2002). Stem cell pluripotency and transcription factor Oct4. *Cell research*, 12(5), 321.
- 3- Boiani, M., & Schöler, H. R. (2005). Developmental cell biology: Regulatory networks in embryo-derived pluripotent stem cells. *Nature reviews Molecular cell biology*, 6(11), 872.
- 4- Evans, M. J., & Kaufman, M. H. (1981). Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *nature*, 292(5819), 154.
- 5- Ellis, J., Baum, C., Benvenisty, N., Mostoslavsky, G., Okano, H., Stanford, W.L., Porteus, M. and Sadelain, M., (2010). Benefits of utilizing gene-modified iPSCs for clinical applications. *Cell Stem Cell*, 7(4), pp.429-430.
- 6- Inoue, H. and Yamanaka, S., (2011). The use of induced pluripotent stem cells in drug development. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 89(5), pp.655-661.
- 7- Sartipy, P., Strehl, R., Björquist, P. and Hyllner, J., (2008). Low molecular weight compounds for in vitro fate determination of human embryonic stem cells. *Pharmacological research*, 58(2), pp.152-157.
- 8- Cai, S.A., Fu, X. and Sheng, Z., (2007). Dedifferentiation: a new approach in stem cell research. *AIBS Bulletin*, 57(8), pp.655-662.
- 9- Alberio, R., Campbell, K.H. and Johnson, A.D., (2006). Reprogramming somatic cells into stem cells. *Reproduction*, 132(5), pp.709-720.
- 10- Morgan, H.D., Santos, F., Green, K., Dean, W. and Reik, W., (2005). Epigenetic reprogramming in mammals. *Human molecular genetics*, 14(suppl_1), pp. R47-R58.

- 11- Freberg, C.T., Dahl, J.A., Timoskainen, S. and Collas, P., (2007). Epigenetic reprogramming of OCT4 and NANOG regulatory regions by embryonal carcinoma cell extract. *Molecular biology of the cell*, 18(5), pp.1543-1553.
- 12- Hochedlinger, K. and Jaenisch, R., (2006). Nuclear reprogramming and pluripotency. *Nature*, 441(7097), p.1061.
- 13- Taranger, C.K., Noer, A., Sørensen, A.L., Håkelién, A.M., Boquest, A.C. and Collas, P., (2005). Induction of dedifferentiation, genomewide transcriptional programming, and epigenetic reprogramming by extracts of carcinoma and embryonic stem cells. *Molecular biology of the cell*, 16(12), pp.5719-5735.
- 14- Hansis, C., Barreto, G., Maltry, N. and Niehrs, C., (2004). Nuclear reprogramming of human somatic cells by xenopus egg extract requires BRG1. *Current Biology*, 14(16), pp.1475-1480.
- 15- Bru, T., Clarke, C., McGrew, M.J., Sang, H.M., Wilmut, I. and Blow, J.J., (2008). Rapid induction of pluripotency genes after exposure of human somatic cells to mouse ES cell extracts. *Experimental cell research*, 314(14), pp.2634-2642.
- 16- Cho, H.J., Lee, C.S., Kwon, Y.W., Paek, J.S., Lee, S.H., Hur, J., Lee, E.J., Roh, T.Y., Chu, I.S., Leem, S.H. and Kim, Y., (2010). Induction of pluripotent stem cells from adult somatic cells by protein-based reprogramming without genetic manipulation. *Blood*, pp. blood-2010.
- 17- Takahashi, K. and Yamanaka, S., (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *cell*, 126(4), pp.663-676.
- 18- Yu, J., Vodyanik, M.A., Smuga-Otto, K., Antosiewicz-Bourget, J., Frane, J.L., Tian, S., Nie, J., Jonsdottir, G.A., Ruotti, V., Stewart, R. and Slukvin, I.I., (2007). Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *science*, 318(5858), pp.1917-1920.
- 19- Liao, J., Wu, Z., Wang, Y., Cheng, L., Cui, C., Gao, Y., Chen, T., Rao, L., Chen, S., Jia, N. and Dai, H., (2008). Enhanced efficiency of generating induced pluripotent stem (iPS) cells from human somatic cells by a combination of six transcription factors. *Cell research*, 18(5), p.600.
- 20- Feng, B., Jiang, J., Kraus, P., Ng, J.H., Heng, J.C.D., Chan, Y.S., Yaw, L.P., Zhang, W., Loh, Y.H., Han, J. and Vega, V.B., (2009). Reprogramming of fibroblasts into induced pluripotent stem cells with orphan nuclear receptor Esrrb. *Nature cell biology*, 11(2), p.197.
- 21- Yu, J., Hu, K., Smuga-Otto, K., Tian, S., Stewart, R., Slukvin, I.I. and Thomson, J.A., (2009). Human induced pluripotent stem cells free of vector and transgene sequences. *Science*, 324(5928), pp.797-801.
- 22- Mali, P., Ye, Z., Hommond, H.H., Yu, X., Lin, J., Chen, G., Zou, J. and Cheng, L., (2008). Improved efficiency and pace of generating induced pluripotent stem cells from human adult and fetal fibroblasts. *Stem cells*, 26(8), pp.1998-2005.
- 23- Park, I.H., Zhao, R., West, J.A., Yabuuchi, A., Huo, H., Ince, T.A., Lerou, P.H., Lensch, M.W. and Daley, G.Q., (2008). Reprogramming of human somatic cells to pluripotency with defined factors. *Nature*, 451(7175), p.141.
- 24- Zhao, Y., Yin, X., Qin, H., Zhu, F., Liu, H., Yang, W., Zhang, Q., Xiang, C., Hou, P., Song, Z. and Liu, Y., (2008). Two supporting factors greatly improve the efficiency of human iPSC generation. *Cell stem cell*, 3(5), pp.475-479.
- 25- Pfannkuche, K., Fatima, A., Gupta, M.K., Dieterich, R. and Hescheler, J., (2010). Initial colony morphology-based selection for iPS cells derived from adult fibroblasts is substantially improved by temporary UTF1-based selection. *PloS one*, 5(3), p. e 9580.

- 26- Marson, A., Foreman, R., Chevalier, B., Bilodeau, S., Kahn, M., Young, R.A. and Jaenisch, R., (2008). Wnt signaling promotes reprogramming of somatic cells to pluripotency. *Cell stem cell*, 3(2), pp.132-135.
- 27- Heng, J.C.D., Feng, B., Han, J., Jiang, J., Kraus, P., Ng, J.H., Orlov, Y.L., Huss, M., Yang, L., Lufkin, T. and Lim, B., (2010). The nuclear receptor Nr5a2 can replace Oct4 in the reprogramming of murine somatic cells to pluripotent cells. *Cell stem cell*, 6(2), pp.167-174.
- 28- Jiang, Y., Jahagirdar, B.N., Reinhardt, R.L., Schwartz, R.E., Keene, C.D., Ortiz-Gonzalez, X.R., Reyes, M., Lenvik, T., Lund, T., Blackstad, M. and Du, J., (2002). Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature*, 418(6893), p.41.
- 29- Zaehres, H. and Schöler, H.R., (2007). Induction of pluripotency: from mouse to human. *Cell*, 131(5), pp.834-835.
- 30- Huangfu, D., Osafune, K., Maehr, R., Guo, W., Eijkelenboom, A., Chen, S., Muhlestein, W. and Melton, D.A., (2008). Induction of pluripotent stem cells from primary human fibroblasts with only Oct4 and Sox2. *Nature biotechnology*, 26(11), p.1269.
- 31- Stadtfeld, M., Nagaya, M., Utikal, J., Weir, G. and Hochedlinger, K., (2008). Induced pluripotent stem cells generated without viral integration. *Science*, 322(5903), pp.945-949.
- 32- Blelloch, R., Venere, M., Yen, J. and Ramalho-Santos, M., (2007). Generation of induced pluripotent stem cells in the absence of drug selection. *Cell stem cell*, 1(3), pp.245-247.
- 33- Maherali, N., Ahfeldt, T., Rigamonti, A., Utikal, J., Cowan, C. and Hochedlinger, K., (2008). A high-efficiency system for the generation and study of human induced pluripotent stem cells. *Cell stem cell*, 3(3), pp.340-345.
- 34- Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K. and Yamanaka, S., (2007). Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *cell*, 131(5), pp.861-872.
- 35- Aasen, T., Raya, A., Barrero, M.J., Garreta, E., Consiglio, A., Gonzalez, F., Vassena, R., Bilić, J., Pekarik, V., Tiscornia, G. and Edel, M., (2008). Efficient and rapid generation of induced pluripotent stem cells from human keratinocytes. *Nature biotechnology*, 26(11), p.1276.
- 36- Li, Y., Zhang, Q., Yin, X., Yang, W., Du, Y., Hou, P., Ge, J., Liu, C., Zhang, W., Zhang, X. and Wu, Y., (2011). Generation of iPSCs from mouse fibroblasts with a single gene, Oct4, and small molecules. *Cell research*, 21(1), p.196.
- 37- Nakagawa, M., Koyanagi, M., Tanabe, K., Takahashi, K., Ichisaka, T., Aoi, T., Okita, K., Mochiduki, Y., Takizawa, N. and Yamanaka, S., (2008). Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts. *Nature biotechnology*, 26(1), p.101.
- 38- Wernig, M., Meissner, A., Foreman, R., Brambrink, T., Ku, M., Hochedlinger, K., Bernstein, B.E. and Jaenisch, R., (2007). In vitro reprogramming of fibroblasts into a pluripotent ES-cell-like state. *nature*, 448(7151), p.318.
- 39- French, A.J., Adams, C.A., Anderson, L.S., Kitchen, J.R., Hughes, M.R. and Wood, S.H., (2008). Development of human cloned blastocysts following somatic cell nuclear transfer with adult fibroblasts. *Stem cells*, 26(2), pp.485-493.
- 40- Lowry, W.E., Richter, L., Yachechko, R., Pyle, A.D., Tchieu, J., Sridharan, R., Clark, A.T. and Plath, K., (2008). Generation of human induced pluripotent stem cells from dermal fibroblasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(8), pp.2883-2888.
- 41- Chang, C.W., Lai, Y.S., Pawlik, K.M., Liu, K., Sun, C.W., Li, C., Schoeb, T.R. and Townes, T.M., (2009). Polycistronic lentiviral vector for "hit and run" reprogramming of adult skin fibroblasts to induced pluripotent stem cells. *Stem cells*, 27(5), pp.1042-1049.

- 42- Brown, M.E., Rondon, E., Rajesh, D., Mack, A., Lewis, R., Feng, X., Zitur, L.J., Learish, R.D. and Nuwaysir, E.F., (2010). Derivation of induced pluripotent stem cells from human peripheral blood T lymphocytes. *PloS one*, 5(6), p. e11373.
- 43- Jia, F., Wilson, K.D., Sun, N., Gupta, D.M., Huang, M., Li, Z., Panetta, N.J., Chen, Z.Y., Robbins, R.C., Kay, M.A. and Longaker, M.T., 2010. A nonviral minicircle vector for deriving human iPS cells. *Nature methods*, 7(3), p.197.
- 44- Sugii, S., Kida, Y., Berggren, W.T. and Evans, R.M., (2011). Feeder-dependent and feeder-independent iPS cell derivation from human and mouse adipose stem cells. *Nature protocols*, 6(3), p.346.
- 45- Sun, N., Panetta, N.J., Gupta, D.M., Wilson, K.D., Lee, A., Jia, F., Hu, S., Cherry, A.M., Robbins, R.C., Longaker, M.T. and Wu, J.C., (2009). Feeder-free derivation of induced pluripotent stem cells from adult human adipose stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(37), pp.15720-15725.
- 46- Kim, J.B., Zaehres, H., Wu, G., Gentile, L., Ko, K., Sebastiano, V., Araújo-Bravo, M.J., Ruau, D., Han, D.W., Zenke, M. and Schöler, H.R., (2008). Pluripotent stem cells induced from adult neural stem cells by reprogramming with two factors. *Nature*, 454(7204), p.646.
- 47- Sommer, C.A., Stadtfeld, M., Murphy, G.J., Hochedlinger, K., Kotton, D.N. and Mostoslavsky, G., (2009). Induced pluripotent stem cell generation using a single lentiviral stem cell cassette. *Stem cells*, 27(3), pp.543-549.
- 48- Carey, B.W., Markoulaki, S., Beard, C., Hanna, J. and Jaenisch, R., (2009). Single-gene transgenic mouse strains for reprogramming adult somatic cells. *Nature methods*, 7(1), p.56.
- 49- Kaji, K., Norrby, K., Paca, A., Mileikovsky, M., Mohseni, P. and Woltjen, K., (2009). Virus-free induction of pluripotency and subsequent excision of reprogramming factors. *nature*, 458(7239), p.771.
- 50- Woltjen, K., Michael, I.P., Mohseni, P., Desai, R., Mileikovsky, M., Hämäläinen, R., Cowling, R., Wang, W., Liu, P., Gertsenstein, M. and Kaji, K., (2009). piggyBac transposition reprograms fibroblasts to induced pluripotent stem cells. *Nature*, 458(7239), p.766.
- 51- Zhou, H., Wu, S., Joo, J.Y., Zhu, S., Han, D.W., Lin, T., Trauger, S., Bien, G., Yao, S., Zhu, Y. and Siuzdak, G., (2009). Generation of induced pluripotent stem cells using recombinant proteins. *Cell stem cell*, 4(5), pp.381-384.
- 52- Kim, D., Kim, C.H., Moon, J.I., Chung, Y.G., Chang, M.Y., Han, B.S., Ko, S., Yang, E., Cha, K.Y., Lanza, R. and Kim, K.S., (2009). Generation of human induced pluripotent stem cells by direct delivery of reprogramming proteins. *Cell stem cell*, 4(6), p.472.
- 53- Zhou, W. and Freed, C.R., (2009). Adenoviral gene delivery can reprogram human fibroblasts to induced pluripotent stem cells. *Stem cells*, 27(11), pp.2667-2674.
- 54- Fusaki, N., Ban, H., Nishiyama, A., Saeki, K. and Hasegawa, M., (2009). 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. *Proceedings of the Japan Academy, Series B*, 85(8), pp.348-362.
- 55- Okita, K., Nakagawa, M., Hyenjong, H., Ichisaka, T. and Yamanaka, S., (2008). Generation of mouse induced pluripotent stem cells without viral vectors. *Science*, 322(5903), pp.949-953.
- 56- Gonzalez, F., Monasterio, M.B., Tiscornia, G., Pulido, N.M., Vassena, R., Morera, L.B., Piza, I.R. and Belmonte, J.C.I., (2009). Generation of mouse-induced pluripotent stem cells by transient expression of a single nonviral polycistronic vector. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(22), pp.8918-8922.

- 57- Jia, F., Wilson, K.D., Sun, N., Gupta, D.M., Huang, M., Li, Z., Panetta, N.J., Chen, Z.Y., Robbins, R.C., Kay, M.A. and Longaker, M.T., (2010). A nonviral minicircle vector for deriving human iPS cells. *Nature methods*, 7(3), p.197.
- 58- Warren, L., Manos, P.D., Ahfeldt, T., Loh, Y.H., Li, H., Lau, F., Ebina, W., Mandal, P.K., Smith, Z.D., Meissner, A. and Daley, G.Q., (2010). Highly efficient reprogramming to pluripotency and directed differentiation of human cells with synthetic modified mRNA. *Cell stem cell*, 7(5), pp.618-630.
- 59- Chen, S., Zhang, Q., Wu, X., Schultz, P.G. and Ding, S., (2004). Dedifferentiation of lineage-committed cells by a small molecule. *Journal of the American Chemical Society*, 126(2), pp.410-411.
- 60- Shi, Y., Desponts, C., Do, J.T., Hahm, H.S., Schöler, H.R. and Ding, S., (2008). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic fibroblasts by Oct4 and Klf4 with small-molecule compounds. *Cell stem cell*, 3(5), pp.568-574.
- 61- Shi, Y., Do, J.T., Desponts, C., Hahm, H.S., Schöler, H.R. and Ding, S., (2008). A combined chemical and genetic approach for the generation of induced pluripotent stem cells. *Cell stem cell*, 2(6), pp.525-528.
- 62- Li, W., Wei, W., Zhu, S., Zhu, J., Shi, Y., Lin, T., Hao, E., Hayek, A., Deng, H. and Ding, S., (2009). Generation of rat and human induced pluripotent stem cells by combining genetic reprogramming and chemical inhibitors. *Cell stem cell*, 4(1), pp.16-19.
- 63- Lin, S.L., Chang, D.C., Chang-Lin, S., Lin, C.H., Wu, D.T., Chen, D.T. and Ying, S.Y., (2008). Mir-302 reprograms human skin cancer cells into a pluripotent ES-cell-like state. *Rna*.

Generation of induced pluripotent stem cells (IPSCs) (A glancing review about methods and techniques)

Mohsen Sheykh hasan^{1*}, Naser Kalhor¹, Reza Tabatabaei Qomi¹, Hoda Fazaeli¹, Mahdiah Ghiasi¹

1- Highly Specialized Jihad Daneshgahi Infertility Center, Stem cell laboratory, Qom, Iran

Mahdiah.ghiasi1360@gmail.com

Abstract

Cell therapy is one of the most principle and promising science in relation to treatment of many diseases. By attention to unique capability of stem cells, these cells can be for treatment as a valuable source in science and medical researches. However, there are a lot of problems in relation with use of embryonic stem cells, which has limited their use. Thus, requirement to find an alternative technique to produce these cells, is one of the most important concerns of scientists to improve and use of this science. Induced pluripotent stem cells, is one of these technologies. Different methods which have the ability of altering gene expression profile and cell proteins, cause to change cell morphology and function in reverse way to undifferentiated cells and generation of stem cells, are developing. These methods include nuclear transfer, use of cell extract and synthetic molecules, forced expression of defined genes and change in cytoplasmic levels. Nowadays, there are development in nonintegration ways, but about increasing efficiency of these methods, many researches are ongoing. In this article techniques, advantages and ahead opportunities in generation of ips cells are examined.

Keywords: induced Pluripotent Stem Cells, iPS, dedifferentiation