مجله ایمنی زیستی
دوره ششم، شماره اول، بهار ۹۲

مروری کوتاه بر روش‌های تولید سلول‌های بنیادی پرتوان القایی

محسن شیخ‌حسن[۱]، رضا طباطبائی‌قمی[۲] و مهدیه غیاثی[۳*]

۱- کارشناس ارشد بیوتکنولوژی، آزمایشگاه سلول‌های بنیادی، جهاد دانشگاهی استان قم، قم، ایران.
۲- کارشناس ارشد زیست شناسی، آزمایشگاه سلول‌های بنیادی، جهاد دانشگاهی استان قم، قم، ایران.
۳- کارشناس ارشد سلولی مولکولی، آزمایشگاه سلول‌های بنیادی، جهاد دانشگاهی استان قم، قم، ایران.
Mahdieh.ghiasi@yahoo.com

چکیده

امروزه سلول‌درمانی یکی از راهبردهای مهم و امیدوارکننده در زمینه درمان بیماری‌ها به شمار می‌رود. با توجه به قابلیت‌های منحصر به فرد سلول‌های بنیادی، می‌توان به‌عنوان منبع ارزشمندی در پژوهش‌های علوم پایه و پزشکی جهت پژوهش و درمان استفاده شوند. در حالی‌که استفاده از سلول‌های بنیادی با توجه به مشکلات اخلاقی مربوط به آن کاربرد این سلول‌ها را محدود کرده است. یکی از ملاحظات 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 (IPSCs)) یکی از مهمترین روش‌ها در رسیدن به این هدف به شمار می‌رود. 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 هستند. این روش‌ها شامل انتقال هسته، استفاده از عصاره سلولی و مولکول‌های مصنوعی، بیان اجباری ژن‌های مشخص و تغییرات سطوح سیتوپلاسمی‌است. امروزه پیشرفت‌هایی در روش‌های غیرادغام شونده (Non-Integrative) 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 روش‌ها، مزیت‌ها و فرصت‌های پیشرو در زمینه تولید سلول‌های بنیادی پرتوان القایی مورد بررسی قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی: سلول‌های بنیادی پرتوان القایی، IPSCs، روش‌های تمایززدایی.

مقدمه

سلول‌های بنیادی قادر به ایجاد هر نوع سلول در بدن هستند. آن‌ها می‌توانند تحت تاثیر عامل‌های 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 پرتوان علاوه بر توانایی ایجاد دو لایه جفتی، قادرند به سه لایه زاینده (اندودرم، مزودرم و اکتودرم) نیز تکوین یابند (۱). براساس این حقیقت که در پستانداران عالی دستیابی به قابلیت همه توانی مشکل است (۲)، جهت حل این مشکل و جایگزینی آن، تمایزیابی به سمت پرتوانی و چند توانی در حال پژوهش است. به‌طوریکه قسمت عمده تلاش‌های علمی‌جهت رسیدن 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 به‌عنوان یک حالت ژنومی در نظر گرفت که در طی تکامل ایجاد می‌شود، به طوری‌که این‌ها می‌توانند به هر کدام از سه نوع لایه در سه رده زاینده تبدیل شوند (۱ و ۳). این سلول‌ها مسول حفظ همیوستازی بافتی هستند به طوری‌که سلول‌های آسیب دیده و یا پیر را با سلول‌های جدید جایگزین می‌کنند (۴). در طی سال‌های گذشته، سلول‌های بنیادی پرتوان جنینی از توده سلولی داخلی جنین انسان مشتق شده‌اند (۲)؛ با این حال، استفاده از این روش در اهداف پژوهش‌هایی محدود بوده و به لحاظ اجتماعی و اخلاقی آن‌چنان پذیرفته شده نیست. به همین دلیل، ضرورت داشتن منابع متفاوتی از سلول‌های بنیادی که بتوان از آن‌ها در پژوهش‌ها تشخیصی یا درمانی استفاده کرد، یک زمینه پژوهشی وسیع و جدیدی را ایجاد می‌کند.

القای پرتوانی در سلول‌های تمایزیافته

این موضوع به معنی عقب گرد در حوزه تکوین به منظور کسب سلول‌های بنیادی از سلول‌هایی است که به‌صورت کامل یا جزیی تمایز یافته‌اند. در این زمینه نتایج دلگرم کننده‌ای به‌دست آمده است. تاکنون، سلول‌های بنیادی پرتوان القایی (IPSCs) از سلول‌های سوماتیک انسان و موش مشتق شده‌اند. اگر چه این سلول‌ها به خوبی در شرایط آزمایشگاهی تکوین می‌یابند، با این حال آزمایشاتی که در شرایط حیاتی صورت می‌پذیرند همیشه نتایج مورد قبول را ارایه نمی‌دهند، به طوری‌که سلول‌های IPSCs را

می‌توان به اندام‌های هدف مختلف پیوند زد اما قابلیت تکثیر و تمایز در برخی از قسمت‌ها و نه همه قسمت‌های اندام را ایجاد می‌کنند (۱). علاوه بر این، براساس 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 براساس فرآیند کارآمد و مطمئن تمایززدایی سلول اتفاق می‌افتد، راهی را ایجاد می‌کند که می‌تواند جایگزین پیوندهای ناموفق شده و امید به زندگی را برای هزاران فرد در سراسر جهان افزایش دهد. هدف این پژوهش بازنگری کلی موضوع تولید سلول‌های بنیادی پرتوان القایی است که مهمترین و امیدبخش‌ترین روش‌های تمایززدایی مورد استفاده در گروه‌های مختلف پژوهشی را در سراسر جهان تشکیل می‌دهد. امروزه در حیوان‌ها نیز از سلول‌های تمایزیافته مختلف برای تولید سلول‌های بنیادی پرتوان القایی استفاده شده است که به‌صورت خلاصه به همراه کلیه‌ی روش‌ها در جدول شماره یک آمده است.

روش‌های القای پرتوانی

نزدیک به ده سال است که دستورالعمل‌های پژوهشی مرتبط با این موضوع به‌صورت گسترده‌ای در حال پیشرفت هستند در حالی که Evans و Kauffman اولین پژوهش‌ها را در مورد تولید سلول‌های بنیادی جنینی حدود سی سال پیش آغاز کردند (۴). رده‌های متفاوت سلول انسان، رت و موش جهت تجزیه و تحلیل ژن‌های دخیل در فرآیند تمایز و حفظ حالت پرتوانی مورد استفاده قرار گرفته‌اند. آگهی اندکی در رابطه با ساز و کارهای برنامه‌ریزی مجدد (Reprogramming) یا تمایززدایی (Differentiation) وجود دارد ولی به‌صورت قاطع بازآرایی کروماتین یک گام کلیدی در این فرآیند است. پس از تکمیل شدن فرآیند تمایززدایی، مسیرهای سیگنال‌دهی LIF، Wnt و BMP که گروهی از مسیرهای انتقال سیگنال (signal transduction) پروتئینی هستند که سیگنال‌ها را از راه گیرنده‌های سطحی سلول از بیرون سلول به داخل آن هدایت می‌کنند برای حفظ سلول‌های بنیادی در فرآیند خود نوزایی درگیر می‌شوند (۷). فرآیند تمایززدایی می‌تواند در مراحل مختلف ارزیابی شود. طی این فرآیند، 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 است. 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 کاریوپلاسم و اندامک‌ها نیز به ترتیب میزان بالاتر و میزان کمتری را در مقایسه با سلول‌های تمایز یافته دارا هستند. 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 برنامه ریزی 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 مثل آنچه که در شرایط حیاتی رخ می‌دهد، ندارند.

روش‌های تمایززدایی

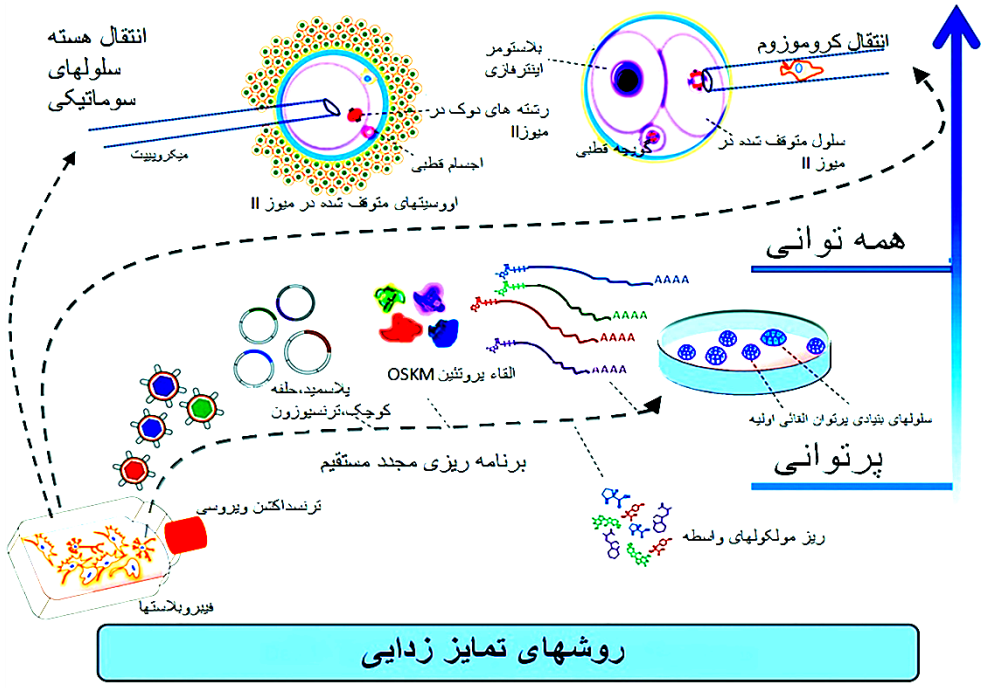
روش‌های متفاوتی جهت انجام برنامه ریزی مجدد تاکنون شناسایی شده اند (شکل شماره۱ و جدول شماره ۲). در این زمینه پژوهش‌های زیادی در مورد تعیین کارآمدترین رده سلولی در رابطه با از بین رفتن تمایز انجام گرفته است.

۱- انتقال هسته‌ای

انتقال هسته سلول‌های سوماتیک (SCNT) 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 به‌طور 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 تمایزیافته‌تر تکوین بهتری را نشان می‌دهند. با توجه به این موضوع که برنامه‌ریزی مجدد در طی فرآیند کلونینگ، به‌صورت تصادفی اتفاق می‌افتد بنابراین بسیاری از نقص‌ها زمانی پدیدار می‌شوند که فرآیند به‌صورت کامل انجام نشود. در این میان نقصی که در نشانه‌گذاری، متیلاسیون دی.ان.اِ و یا به‌صورت ژنتیکی در یک ژن خاص و یا در توالی‌های تکراری وبه صورت اپی‌ژنتیکی شامل تغییرات وسیع در بیان ژن، استیلاسیون و متیلاسیون هیستون‌ها دیده می‌شود می‌تواند بر روی فعال‌سازی کروموزوم X تأثیرگذار باشد (۱۰).

جدول ۱- تولید سلول‌های بنیادی پرتوان القایی در حیوانات

ردیف	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 القا شونده با دارو(داکسی سیکلین)	Wu و همکاران (۲۰۰۹)
۴	خوک	سلول‌های بنیادی مزانشیمی‌خوک	Sox2,Klf4,Oct4,C-myc انسانی, Nanog, Line28	سیستم بیانی رتروویروسی	West و همکاران (۲۰۱۰)
۵	گاو	سلول‌های فیبروبلاست جنینی گوساله	Sox2,Klf4,Oct4,C-myc , Nanog, Line28گاوی	سیستم بیانی رتروویروسی	Han و همکاران (۲۰۱۱)
۶	گوسفند	سلول‌های فیبروبلاست	Sox2,Klf4,Oct4,C-myc انسانی	سیستم بیانی لنتی‌ویروسی القا شونده با آنتی بیوتیک تتراسایکلین	Li و همکاران (۲۰۱۱)
۷	گوسفند	سلول‌های سوماتیک گوسفند	Sox2,Klf4,Oct4,C-myc انسانی, Nanog,Line28, SV40 large T و hTERT	سیستم بیانی لنتی‌ویروسی القا شونده با دارو	Bao وهمکاران (۲۰۱۱)
۸	بز	سلول‌های فیبروبلاست گوش	Sox2,Klf4,Oct4,C-myc انسانی	سیستم بیانی لنتی‌ویروسی القا شونده با دارو (داکسی سیکلین)	Ren وهمکاران (۲۰۱۱)
۹	اسب	سلول‌های فیبروبلاست	Sox2,Klf4,Oct4,C-myc انسانی	سیستم بیانی مبتنی بر ترانسپوزون Piggy Bac	Nagy و همکاران (۲۰۱۱)
۱۰	سگ	سلول‌های فیبروبلاست بالغ	Sox2,Klf4,Oct4,C-myc انسانی	سیستم بیانی رتروویروسی	Luo و همکاران (۲۰۱۱)
۱۱	موش	سلول‌های فیبروبلاست گوش سلول‌های بنیادی مزانشیمی‌بافت چربی	Sox2,Klf4,Oct4,C-myc موشی	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	بز شیری	سلول‌های فیبروبلاست جنینی بز شیری	Sox2,Klf4,Oct4,C-myc انسانی	سیستم بیانی لنتی‌ویروسی	Chu و همکاران (۲۰۱۵)



شکل ۱- روش‌های تمایززدایی جهت تولید سلول‌های بنیادی پرتوان القایی

جدول ۲- روش‌های تولید سلول‌های بنیادی پرتوان القایی

روش	تکنیک	مزایا	معایب	کارایی
انتقال هسته سلول سوماتیک	هسته سلول سوماتیک با یک اووسیت بدون هسته امتزاج داده می‌شود.	رده‌های سلولی انسان می‌توانند به همراه امتزاج همولوگ ایجاد شوند.	نتایج برنامه‌ریزی اپی ژنتیک مجدد جهت پیش‌بینی، ناکارآمد است.	-
عصاره سلولی	به منظور بیان پروفایل‌های سلول‌های بنیادی جنینی، سلول‌های تمایز یافته با آن‌ها مخلوط و کشت می‌شوند.	این روش علاوه بر این‌که امکان آزمون‌های بیوشیمیایی و کینتیکی برنامه‌ریزی مجدد را فراهم می‌سازد، امکان استفاده از نتایج حاصله جهت شناسایی فاکتورهای دخیل در برنامه‌ریزی را نیز مهیا می‌کند.	در صورتی‌که 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 پژوهش‌ها با استفاده از آن صورت پذیرفته و دارای بالاترین کارایی در میان روش‌های مورد استفاده در تولید سلول‌های بنیادی پرتوان القایی است.	استفاده از رتروویروس و آدنوویروس زمانی که آن‌ها به درون ژنوم میزبان تلفیق شوند می‌تواند به فعال‌سازی مجدد ژن‌های سرطانی منجر شود.	کارایی این روش بسته به رده سلولی بین ۰/۰۰۱ تا ۴/۴ درصد محاسبه شده است.
مولکول‌های سنتتیک	ترکیبات دارای وزن مولکولی پایین به‌عنوان معرف برنامه‌ریزی مجدد به‌کار می‌روند.	به‌عنوان ابزاری مناسب جهت کنترل سرنوشت سلول‌های بنیادی و همچنین جهت درک بهتر فرآیندهای تکاملی به‌کار می‌رود.	ترکیب منفرد از مولکول‌های سنتتیک قابلیت تولید سلول‌های بنیادی پرتوان القایی 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 آر.ان.اِ	هدف این روش تغییر پروفایل ساخت پروتئین سلولی با استفاده از میکرو آر.ان.اِ است.	هنگامی‌که با بیان اجباری ژن‌های مشخص همراه شوند، mir290 می‌تواند جایگزین c-Myc شود.	برهم کنش‌های بین میکرو آر.ان.اِها و فاکتورهای نسخه برداری به‌خوبی شناخته نشده است.	-

تنها هسته‌هایی که تحت برنامه‌ریزی مجدد اپی‌ژنتیکی قرار گرفته‌اند قادربه تولید سلول‌های بنیادی جنینی به روش SCNT هستند (۹).

۲- عصاره‌های سلولی

این روش شامل استفاده از عصاره سلول تمایزیافته، سلول‌های بنیادی پرتوان و یا سلول‌های بنیادی جنینی است (۱۱). نتایج حاصل از این روش بسیار جالب هستند بطوریکه امکان خالص‌سازی ترکیب‌های پروتئینی با قابلیت برنامه‌ریزی مجدد را فراهم می‌کنند (۱۲). آزمایشاتی که با استفاده از عصاره تخم زنوپوس انجام گرفته، نشان دادند که کارایی بازآرایی بخش کروماتینی هسته تمایزیافته بستگی به در معرض قرارگرفتن با عصاره تخم میتوزی دارد که همانندسازی دی. ان. اِ جنینی را تسهیل می‌کند (۱۲ و ۱۴). Bru و همکارانش(۱۵) ژن‌های Oct4، Sox2، Klf4 و cMyc (OSKM) را پس از قرار دادن فیبروبلاست‌ها در معرض عصاره سلول‌های بنیادی جنینی به درون ژنوم فیبروبلاست انتقال دادند. Freberg و همکارانش(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 دی. ان. اِ و تغییرات هیستونی بر روی ناحیه تنظیمی‌این ژن‌ها شوند. فیبروبلاست‌هایی که در معرض عصاره سلول‌های بنیادی جنینی موش قرار گرفتند نشان دادند که یک القای قدیمی‌ژن Oct4 در آن‌ها وجود داشته است که بیان آن باعث دمتیلاسیون دی. ان. اِ و نگهداشتن آن در حد پایه می‌شود (۱۳). یکی از عیب‌های این روش مشکل‌بودن نتیجه گیری 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 ژن-هایی 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 سوماتیک ابتدایی 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 شبیه سازی می‌کنند ایجاد نمایند.

۳- 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 (۹ و۱۷). ترکیب-های متفاوت ژنی از جمله Nanog (۳و ۹ و۱۸)، Stat3 (۳)، LIN28 (۱۸و ۱۹)، Esrrb (۲۰)، Sv40LT (۲۱-۲۳)، UTF-1(۲۴ و۲۵)، P53، SiRNA (۲۴)، hTERT (۲۳)، WNT3a (۲۶) و Nr5al (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 غیر الحاقی استفاده شده است که در جدول شماره سه به این روش‌ها و مزایا و معایب آنها به صورت کلی اشاره شده است.

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

عیب‌ها	مزیت‌ها	روش مورد استفاده	طبقه‌بندی روش
الحاق به ژنوم	کارا و قابل تکثیر	رتروویروس‌ها لنتی‌ویروس‌ها	**روش تلفیقی**
احتمال الحاق به ژنوم و کارایی متوسط	عاری از وکتور	آر.ان.اِ خطی	
کند و کارایی پایین و احتمال الحاق ژنومی	حذف وکتور احتمالی	ترانسپوزون PiggyBac	
کند و غیرکارا	هیچ الحاق ژنومی‌وجود ندارد	آدنوویروس	
رقت دوز ژن‌ها و ناکارامدی و احتمال الحاق به ژنوم	هیچ الحاق ژنومی‌وجود ندارد	پلاسمیدهای اپیزومال	**روش غیرتلفیقی**
ناکارامدی و کندی	عاری ازتراژن	پروتئین‌ها و مولکول‌های کوچک	
دوز بالای ژن‌های پیش سرطان‌زا و نیاز به عوامل ترانسفکشن چندگانه	عاری ازتراژن و کارا	mRNA	
به طور معمولی در ترکیب با دیگر روش‌ها ایجاد موفقیت می‌کند	عاری ازترانسژن	miRNA	

الف- روش‌های الحاقی

مشکل اصلی این روش استفاده از ناقل‌های رتروویروسی، لنتی‌ویروسی یا آدنوویروسی برای وارد کردن ژن‌های تمایززدا است. رتروویروس‌ها زمانیکه به‌طورکامل به داخل ژنوم سلول راه می‌یابند می‌توانند سبب فعال سازی مجدد ژن‌های سرطانی شوند (۲۸ و ۲۹). 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 کارایی گزارش شده در رابطه با آنها است (۳۰ و ۳۱).

آغازگرهای القاپذیر و ثابت لنتی‌ویروسی همانند وکتورهای لنتی‌ویروسی با قابلیت حذف از ژنوم (excisable) و القاپذیری با آنتی‌بیوتیک داکسی‌سایکلین(doxycycline inducible) مورد استفاده قرار می‌گیرند (۱۸و ۳۲و ۳۳). بدون شک کاری که در سال 2006 به‌وسیله Takashi و همکارانش 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 ابتدایی‌تری از تکوین قرار داشته باشد را افزایش می‌دهند (۳۰ و ۳۵ و ۳۸).

پس مسئله نهایی که باقی می‌ماند این است، یافتن تعداد حداقل ژن‌های لازم که بتوانند سلول‌های سوماتیک را به مرحله پرتوانی برسانند. تاکنون در این پژوهش‌ها از سلول‌های مختلفی شامل سلول‌های کبدی موشی(murine hepatic cells) (۱۷)، فیبروبلاست‌های جنینی یا بالغ موشی (۲۸، ۳۴، ۳۷و ۳۹) یا فیبروبلاست‌های جنینی و بالغ انسانی (۱۳ و ۲۳ و ۳۰ و۳۱ و ۳۳ و ۳۷ و ۳۸ و ۴۰ و ۴۱)، کراتینوسیت‌ها (۳۳ و ۳۵)، لنفوسیت‌ها (۴۲)، هپاتوسیت‌ها (۱۳)، بافت چربی (۴۳–۴۸)، سلول‌های مغز (۴۹)، طحال (۲۸)، پیش سازهای عصبی، غدد آدرنال، سلول‌های عضلانی، سلول‌های اپیتلیوم روده، سلول‌های بنیادی مزانشیمی(۴۶–۴۸)، سلول‌های استرومای مزانشیمی، سلول‌های آمنیونی، سلول‌های بندناف، سلول‌های بنیادی پالپ دندان و سلول‌های بتای پانکراس برای این آزمایش‌ها استفاده شده است.

بهترین نتیجه با سلول‌های چربی و کراتینوسیت‌ها به‌دست آمد، بطوریکه کارآمدی تمایززدایی بیش از ۰/۱درصد بود که به میزان ۱۰۰ برابر کارآمدتر و دو برابر سریعتر از برنامه‌ریزی مجدد فیبروبلاست‌های انسانی با استفاده از وکتورهای دی. ان. اِ بود (۳۵). استفاده از وکتورهای رتروویروسی، لنتی-ویروسی و آدنوویروسی به‌تنهایی می‌توانند موضوعی برای تمرکز کردن باشند. Sommer و همکارانش (۵۰) 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 کارایی آن چند برابر پژوهش‌های قبلی بود و میزان کارایی آن به بیش از ۰/۵درصد رسید. در ادامه آن پژوهش‌هایی با استفاده از روش‌های پلی-سیسترونیک و نوترکیبی‌های همولوگ نیز گزارش شده است که کارایی آن‌ها ۵ برابر بیشتر از روش‌های مونوسیسترونیک با وکتورهای تک ژنی است (۴۱ و ۵۱). استفاده از سیستم‌های نوترکیب همولوگ که از جایگاه‌های LoxP برخوردار هستند گام‌های ابتدایی به سمت روش‌های غیر الحاق شونده را نمایان می‌کند، این روش‌ها خطرهای انکوژنیک را با حذف ترانس ژن رفع می‌کنند. Kaji و همکارانش (۵۲) در پژوهش‌هایشان توانستند با به‌کاربردن یک وکتور غیرویروسی خاص با استفاده از ترکیب پپتید 2A و سیستم ترانسپوزون piggyback و فاکتورهای رونویسی، به‌طور کارآمدی سلول‌های فیبروبلاست جنینی موش (MEF) و فیبروبلاست‌های انسان را تمایززدایی کنند. کارایی برنامه‌ریزی مجدد این کار بیش از ۲/۵درصد بود.

ب- روش‌های غیرتلفیقی (Non-integrativ) در ژنوم

سلول‌های بنیادی پرتوان القایی برای نخستین بار توسط انتقال چهار فاکتور مشخص به وسیله ناقلین رتروویروسی تولید شدند که روشی مؤثر و کارآمد است. با این وجود، می‌بایستی جهت کاربردهای بالینی تا آنجا که ممکن است از ادغام ویروس به ژنوم جلوگیری به‌عمل آید که علت این امر فعال شدن غیرمنتظره ترانسژن‌های سرطانی یا تخریب ژنوم است که در اثر تشکیل تومور احتمالی رخ می‌دهد. بسیاری از پژوهش‌ها حاکی از مسلط شدن بر این مشکل هستند. سولدنر(Soldner) و همکارانش با استفاده از ناقل لنتی‌ویروسی که توانایی آلوده کردن سلول‌هایی که در حال تقسیم و تکثیر نباشند را دارا بوده و علاوه بر آن، حاوی توالی loxP در ناحیه تکراری انتهایی(LTR)′۳ بود جهت انتقال فاکتورهای تمایززدایی به سلول استفاده کردند. در این پژوهش، پس از اتمام فرآیند تمایززدایی 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 اپیزومی‌و سیستم‌های تحویل(DELIVERY) آر.ان.اِ و پروتئین هستند (۵۳ و ۵۴ و ۵۵). در روش‌های غیرتلفیقی از آدنوویروس ایجاد کننده نقص در همانندسازی و یا وکتورهای ویروسی سندایی F-deficient استفاده می‌کنند. روش‌های غیرتلفیقی اپیزومال غیر همانندساز (۵۶–۶۰) یا همانندساز (۲۱) امکان تولید سلول‌های بنیادی پرتوان القایی فاقد پلاسمید را تضمین نکردند. بطوریکه با استفاده از اپیزومال غیر همانندساز و همانندساز 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 هستند که پایداری آنها بیشتر بوده و می‌توانند جهت بیان عوامل برنامه‌ریزی شده مجدد برای تولید سلول‌های بنیادی پرتوان القایی مورد استفاده قرار گیرند. مسئله مهمی‌که در رابطه با این پلاسمیدها وجود دارد استفاده از پروتئین سرطانی SV40LT به عنوان عامل برنامه‌ریزی مجدد است که احتمال ایجاد سرطان‌زایی را بالا می‌برد (۲۱). یک روش جایگزین این روش توسط jia و همکاران پیشنهاد شد که درآن با استفاده از ناقل‌های مبنی حلقوی غیرالحاقی به ژنوم که اندازه آنها در مقایسه با اپیزوم کوچکتر است میزان کارایی در تولید سلولهای بنیادی پرتوان القایی که در مدت ۱۴–۱۶ روز ایجاد شدند افزایش چشمگیری یافت (۶۰).بمنظور حذف کامل وکتورهای ویروسی یا پلاسمیدی یک روش پیشنهادی تبدیل (conversion)آر.ان.اِ بود که کارایی این روش با استفاده از فیبروبلاست به بیش از ۴/۴ درصد 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 خطرات سرطان‌زایی را افزایش دهد. سلول‌های بدست آمده طی این روش به‌عنوان pIPS (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 فرآیند پیچیده است که قابلیت تجدید آزمایشگاهی آنرا تضمین نمی‌کند.

۱-۲-۱- مولکول‌های مصنوعی

شناسایی ترکیباتی با وزن مولکولی پایین که به‌عنوان عوامل برنامه‌ریزی مجدد عمل می‌کنند یکی از موضوعات مرتبط با شیمی‌در

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 برنامه-ریزی مجدد سلولی در میوبلاست‌های C2C12 را نشان می‌دهد که سلول‌هایی با قابلیت تمایزی استخوان‌ساز(osteogenic) و چربی‌ساز(adipogenic) را ایجاد می‌کند (۷ و ۹ و ۶۲). در سال‌های گذشته به‌طور عمده‌ای ممانعت کننده‌های دی. ان. اِ متیل ترانسفراز و هیستون داستیلاز (HDAC) جهت افزایش کارایی برنامه‌ریزی مجدد با استفاده از بیان اجباری ژن‌های مشخص و یا روش‌های انتقال هسته سلول‌های سوماتیک به‌کار رفته‌اند. رایج‌ترین ممانعت‌کننده‌های HDAC شامل suberoylanide hidroxamic acid (SAHA), trichostatin A (TSA)و والپروئیک اسید (vpa) هستند. حتی معروف‌ترین ممانعت‌کننده دی. ان. اِ متیل ترانسفراز که (5′ azaC (Azacitidine، RG108 و BIX-01294 هستند به‌منظور یافتن میزان کارایی‌شان هنوز مورد تحقیق قراردارند (۶۳ و ۶۴). همچنین استروئید گلوکوکورتیکوئید دگزامتازون، ممانعت کننده TGF-β A-83-01 (۶۵) و L-type calcium agonist BayK8644(۶۳) در حال پژوهش هستند. 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 MEF(Mouse embryonic fibroblast) انجام شد با استفاده از 5′ azaC و دگزامتازون کارایی برنامه‌ریزی مجدد به ترتیب ۱۰ و ۲.۶ برابر افزایش یافت. از طرف دیگر زمانیکه از vpa استفاده شد کارایی آزمایش را ۱۰۰ برابر بیشتر از آزمایشات کنترل در حالت وابسته به دوز رسانید. ممکن است vpa یک مرحله کنترل کننده سرعت را در برنامه‌ریزی مجدد کنترل کند، اما به‌تنهایی برای برنامه‌ریزی مجدد MEF کافی نیست (۳۰). هنگامی‌که ۳ ژن مورد استفاده قرار می‌گیرند، 5′ azaC برنامه‌ریزی مجدد را سه برابر بهبود می‌بخشد، در حالیکه vpa بیش از ۵۰ برابر آن را بهبود می‌بخشد. زمانی که روش Knock Out مورد استفاده قرار می‌گیرد، RG108 کارایی را نزدیک به ۳۰ برابر و BayK8644 آن را ۱۰ برابر افزایش می‌دهد. به‌تازگی Li و همکارانش (۳۶) قادر به ایجاد سلول‌های IPS از فیبروبلاست جنینی و بالغ موشی در حضور ژن Oct4 به تنهایی و یا ترکیبی از مولکول‌های مصنوعی‌شدند.

جدول ۴- ترکیب‌های 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 متیل‌ترانسفراز
Pamate	مهارکننده هیستون دمتیلاز
5-azacytidine	مهارکننده دی.ان.اِ متیل‌ترانسفراز
RG108	مهارکننده دی.ان.اِ متیل‌ترانسفراز
SB431542+PD0325901	مهارکننده ALK5+ مهارکننده MEK
A-83-01	مهارکننده پذیرنده β-TGF
CHIR99021	مهارکننده GSK3
RepSox	مهارکننده Tgfbr1 کیناز
PS48	فعال کننده PDK1
Vitamin C	ماده غذایی ضروری

ترکیب‌ها با وزن مولکولی پائین برای کنترل سرنوشت سلول‌های بنیادی و نیز درک بیشتر فرایندهای تکوینی می‌توانند مفید باشند (۷). اما سوال همچنان باقی می‌ماند که آیا روزی خواهد رسید که برنامه‌ریزی مجدد سلول با استفاده از یک روش شیمیایی خالص انجام شود؟

۴-۱-۱- miRNA

هدف این روش تغییر الگوی سنتز پروتئین‌های سلول است. با کشف آر.ان.اِهای 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 تمایزیافته را حفظ می‌کند تا اینکه تمایز سلول را آغازگری کند. پاسخ سلولی به فاکتورهای خارجی که بیان ژن را برنامه‌ریزی مجدد می‌کنند با تغییر بارگذاری (Load) آنها می‌تواند بهبود یابد که سبب سازگاری بیشتر سلول برای کسب حالت پرتوانی می‌شود (۹). آزمایشاتی با استفاده از میکروآر.ان.اِی 302 در رده‌های سلول‌های سرطانی PC3 و Colo انجام شده است. بطوریکه سلول‌های بنیادی پرتوان القایی توسط miRNA که تمایز در آن‌ها از بین رفته بود، قادر به تمایز به سلول‌های پیش‌ساز شبه نورونی، غضروفی، فیبروبلاستی و اسپرماتوگونی بودند (۶۶). مجموعه mir-290 (Cluster) در MEFها

مورد ارزیابی قرار گرفت. آزمایشات 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.آر.ان.اِهای کوچک می‌توانند جایگزین فاکتورهای اضافی شوند که در حقیقت جایگزین استفاده از عناصر دی. ان. اِ انتقال یافته را فراهم می‌سازند (۶۷). بیان افزایش یافته miRNA-145 از خودنوزایی سلول‌های بنیادی جنینی انسان جلوگیری می‌کند، همچنین بیان ژن‌های پرتوانی را سرکوب کرده و تمایز مجدد رده سلولی را القا می‌کند (۶۸). اگر بازدهی آلودگی با miRNAها افزایش یابد و همچنین یک مجموعه استانداردی از miRNAهای دخیل در فرآیند برنامه ریزی مجدد شناسایی شوند، این روش می‌تواند روش امیدوارکننده‌ای برای تولید سلول‌های بنیادی پرتوان القایی محسوب شود.

۲-۱- چشم‌اندازهای آینده

روش‌های بسیار زیادی تاکنون شناسایی شده است، اما تا شناسایی بهترین روش هنوز نیاز به پژوهش‌های بیشتری است. بدون شک، قسمت عمده تلاش‌ها به فرآیندهای سریعتر، مطمئن‌تر و کارآمدتر تمرکز یافته‌اند. بیان اجباری ژن‌های مشخص روشی است که بیش از بقیه مورد پژوهش قرار گرفته است. بیشترین تلاش‌های پژوهشی بر ساز و کارهای غیرتلفیقی و بهینه‌سازی ترکیب ژنی موردنیاز برای تولید سلول‌های بنیادی پرتوان القایی متمرکز شده‌اند (۶۹). با اینکه استفاده از پروتئین نوترکیب مطمئن‌تر است اما نتایجی که تاکنون بدست آمده امیدوارکننده نیستند بطوریکه این روش غیرکارآمد با سرعت پائین عمل می‌کند (۵۴ و ۵۵). 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 پائین که بتوانند به‌عنوان 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 آر.ان.اِ و نقش آن در فرآیند تمایززدایی بدست بیاید مشکل روش غیرتلفیقی با استفاده از این روش حل می‌شود. کارایی و مشکلات مربوط به روش غیرتلفیقی به‌عنوان 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 تجزیه و تحلیل قرار گیرد. پس می‌توان گفت که IPS، در واقع سلول‌های بنیادی جنینی را شبیه‌سازی می‌کند و می‌تواند به‌عنوان جایگزین آنها برای استفاده در سلول درمانی به‌کار رود (۷۰-۷۲).

نتیجه‌گیری

برای رسیدن به سطح کاربردی و کلینیکی این روش مشکلات زیادی باقیمانده‌اند که حل نشده‌اند. امیدوارکننده‌ترین روش، بیان اجباری ژن‌هاست. عمده‌ترین قسمت تلاش‌های پژوهشی 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 زیست درمان جهانی که مرتبط با ترمیم بافت هستند برجسته‌ترین مفهومی‌است که تلاش‌های گروه‌های پژوهشی را در سراسر جهان به این شبکه مورد توجه قرار می‌دهد. روش‌های 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 هستند 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 سازوکارهای سلولی و مولکولی پرتوانی سلول‌های بنیادی وجود دارد، مثل درک بهتر بازآرایی الگوی داخلی سلول که می‌تواند پاسخ بسیاری از سوالات موجود باشد. این روش باعث می‌شود که رده‌های خاصی از سلول‌های بنیادی یک بیمار برای پژوهش سازوکارهای بیماری متفاوت مورد استفاده قرار بگیرند و می‌تواند کارآمدی کشف دارو را افزایش دهد. این روش یک ابزار برای آزمایشات سم‌شناسی بوده و غربالگری بیمار و درمان‌های ترمیمی را ممکن می‌سازد و همچنین از لحاظ اقتصادی آن مقرون به صرفه‌تر است. دانشمندان در مقابل یک راه حل بسیار چالش بر انگیز قرار دارند. در واقع، تمام تلاش‌های خلاصه‌بندی شده در نهایت یک رویکرد کلینیکی را حاصل می‌کند که می‌تواند مسیر درمان بیماری‌ها را تغییر دهد.

References **منابع مورد استفاده**

1. **Smith A. (2006).** A glossary for stem-cell biology. 441(1060).
2. **Pan GJ, Chang ZY, Schoeler HR, Pei D. (2002).** Stem cell pluripotency and transcription factor Oct4. Cell Research. 12(5-6):321-9.
3. **Boiani M, Schöler HR. (2005).** Regulatory networks in embryo-derived pluripotent stem cells. Nat Rev MolCellBiol. 6(11):872-84.
4. **Evans MJ, Kaufman MH. (1981).** Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. Nature. 292(5819):154-6.
5. **Ellis J, Baum C, Benvenisty N, Mostoslavsky G, Okano H, Stanford WL, Porteus M, Sadelain M. (2010).** Benefits of utilizing gene-modified iPSCs for clinical applications. Cell Stem Cell. 7(4):429-30.
6. **Inoue H, Yamanaka S. (2011).** The use of induced pluripotent stem cells in drug development. Clinical Pharmacology and Therapeutics. 89(5):655-61.
7. **Sartipy P, Strehl R, Björquist P, Hyllner J. (2008).** Low molecular weight compounds for in vitro fate determination of human embryonic stem cells. Pharmacol Res. 58(2):152-7.
8. **Cai S, Fu Z, Sheng Z. Dedifferentiation. (2007).** a new approach in stem cell research. Bioscience. 57(8):655-62.
9. **Alberio R, Campbell KH, Johnson AD. (2006).** Reprogramming somatic cells into stem cells. Reproduction. 132(5):709-20.
10. **Morgan HD, Santos F, Green K, Dean W, Reik W. (2005).** Epigenetic reprogramming in mammals. Hum Mol Genet; 14 Spec No 1:R47-58.
11. **Freberg CT, Dahl JA, Timoskainen S, Collas P. (2007).** Epigenetic reprogramming of OCT4 and NANOG regulatory regions by embryonal carcinoma cell extract. Mol Biol Cell. 18(5):1543-53.
12. **Hochedlinger K, Jaenisch R. (2006).** Nuclear reprogramming and pluripotency. Nature. 441(7097):1061-7.
13. **Taranger CK, Noer A, Sørensen AL, Håkelien AM, Boquest AC, Collas P. (2005).** Induction of dedifferentiation, genomewide transcriptional programming, and epigeneticreprogramming by extracts of carcinoma and embryonic stem cells. Mol Biol Cell. 16(12):5719-35.
14. **Hansis C, Barreto G, Maltry N, Niehrs C. (2004).** Nuclear reprogramming of human somatic cells by xenopus egg extract requires BRG1. Curr Biol. 14(16):1475-80.
15. **Bru T, Clarke C, McGrew MJ, Sang HM, Wilmut I, Blow JJ. (2008).** Rapid induction for pluripotency genes after exposure of human somatic cells to mouse ES cell extracts. Exp Cell Res. 314(14):2634-42.
16. **Cho HJ, Lee CS, Kwon YW, Paek JS, Lee SH, Hur J, Lee EJ, Roh TY, Chu IS, Leem SH, Kim Y, Kang HJ, Park YB, Kim HS. (2010).** Induction of pluripotent stem cells from adult somatic cells by protein-based reprogramming without genetic manipulation. Blood. 116(3):386-95.

17. **Takahashi K, Yamanaka S. (2006).** Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. Cell. 126(4):663-76
18. **Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, Antosiewicz-Bourget J, Frane JL, Tian S, Nie J, Jonsdottir GA, Ruotti V, Stewart R, Slukvin II, Thomson JA. (2007).** Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. Science. 318(5858):1917-20.
19. **Liao J, Wu Z, Wang Y, Cheng L, Cui C, Gao Y, Chen T, Rao L, Chen S, Jia N, Dai H, Xin S, Kang J, Pei G, Xiao L.(2008).** Enhanced efficiency of generating induced pluripotent stem (iPS) cells from human somatic cells by a combination of six transcription factors. Cell Res. 18(5):600-3.
20. **Feng B, Jiang J, Kraus P, Ng JH, Heng JC, Chan YS, Yaw LP, Zhang W, Loh YH, Han J, Vega VB, Cacheux-Rataboul V, Lim B, Lufkin T, Ng HH. (2009).** Reprogramming of fibroblasts into induced pluripotent stem cells with orphan nuclear receptor Esrrb. Nat Cell Biol. 11(2):197-203.
21. **Yu J, Hu K, Smuga-Otto K, Tian S, Stewart R, Slukvin II, Thomson JA.(2009).** Human induced pluripotent stem cells free of vector and transgene sequences. Science. 324(5928):797-801.
22. **Mali P, Ye Z, Hommond HH, Yu X, Lin J, Chen G, Zou J, Cheng L. (2008).** Improved efficiency and pace of generating induced pluripotent stem cells from human adult and fetal fibroblasts. Stem Cells. 26(8):1998-2005.
23. **Park IH, Zhao R, West JA, Yabuuchi A, Huo H, Ince TA, Lerou PH, Lensch MW, Daley GQ. (2008).** Reprogramming of human somatic cells to pluripotency with defined factors. Nature. 451(7175):141-6.
24. **Zhao Y, Yin X, Qin H, Zhu F, Liu H, Yang W, Zhang Q, Xiang C, Hou P, Song Z, Liu Y, Yong J, Zhang P, Cai J, Liu M, Li H, Li Y, Qu X, Cui K, Zhang W, Xiang T, Wu Y, Zhao Y, Liu C, Yu C, Yuan K, Lou J, Ding M, Deng H.(2008).** Two supporting factors greatly improve the efficiency of human iPSC generation. Cell Stem Cell. 3(5):475-9.
25. **Pfannkuche K, Fatima A, Gupta MK, Dieterich R, 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):e9580.
26. **Marson A, Foreman R, Chevalier B, Bilodeau S, Kahn M, Young R. (2008).** Wnt signaling promotes reprogramming of somatic cells to pluripotency. Cell Stem Cell. 3(2):132-5.
27. **Heng JC, Feng B, Han J, Jiang J, Kraus P, Ng JH, Orlov YL, Huss M, Yang L, Lufkin T, Lim B, Ng HH. (2010).** The nuclear receptor Nr5a2 can replace Oct4 in the reprogramming of murine somatic cells to pluripotent cells. Cell Stem Cell. 6(2):167-74.
28. **Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, Schwartz RE, Keene CD, Ortiz-Gonzalez XR, Reyes M, Lenvik T, Lund T, Blackstad M, Du J, Aldrich S, Lisberg A, Low WC, Largaespada DA, Verfaillie CM. (2002).**

Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. Nature. 418(6893):41-9.
29. **Zaehres H, Schöler HR. (2007).** Induction of pluripotency: from mouse to human. Cell. 131(5):834-5.
30. **Huangfu D, Osafune K, Maehr R, Guo W, Eijkelenboom A, Chen S, Muhlestein W, Melton DA. (2008).** Induction of pluripotent stem cells from primary human fibroblasts with only Oct4 and Sox2. Nat Biotechnol. 26(11):1269-75.
31. **Stadtfeld M, Nagaya M, Utikal J, Weir G, Hochedlinger K. (2008).** Induced pluripotent stem cells generated without viral integration. Science. 322(5903):945-9.
32. **Blelloch R, Venere M, Yen J, Ramalho-Santos M. (2007).** Generation of induced pluripotent stem cells in the absence of drug selection.Cell Stem Cell. 1(3):245-7.
33. **Maherali N, Ahfeldt T, Rigamonti A, Utikal J, Cowan C, Hochedlinger K. (2008).** A high-efficiency system for the generation and study of human induced pluripotent stem cells. Cell Stem Cell. 3(3):340-5.
34. **Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, Yamanaka S. (2007).** Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. Cell. 131(5):861-72.
35. **Aasen T, Raya A, Barrero MJ, Garreta E, Consiglio A, Gonzalez F, Vassena R, Bilić J, Pekarik V, Tiscornia G, Edel M, Boué S, Izpisúa Belmonte JC. (2008).** Efficient and rapid generation of induced pluripotent stem cells from human keratinocytes. Nat Biotechnol. 26(11):1276-84.
36. **Li Y, Zhang Q, Yin X, Yang W, Du Y, Hou P, Ge J, Liu C, Zhang W, Zhang X, Wu Y, Li H, Liu K, Wu C, Song Z, Zhao Y, Shi Y, Deng H. (2011).** Generation of iPSCs from mouse fibroblasts with a single gene, Oct4, and small molecules. Cell Res. 21(1):196-204.
37. **Nakagawa M, Koyanagi M, Tanabe K, Takahashi K, Ichisaka T, Aoi T, Okita K, Mochiduki Y, Takizawa N, Yamanaka S. (2008).** Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts. Nat Biotechnol. 26(1):101-6.
38. **Wernig M, Meissner A, Foreman R, Brambrink T, Ku M, Hochedlinger K, Bernstein BE, Jaenisch R.(2007).** In vitro reprogramming of fibroblasts into a pluripotent ES-cell-like state. Nature. 448(7151):318-24.
39. **French AJ, Adams CA, Anderson LS, Kitchen JR, Hughes MR, Wood SH. (2008).** Development of human cloned blastocysts following somatic cell nuclear transfer with adult fibroblasts. Stem Cells. 26(2):485-93.
40. **Lowry WE, Richter L, Yachechko R, Pyle A, Tchieu J, Sridharan R, et al.(2008).** Generation of human induced pluripotent stem cells from dermal fibroblasts. PNAS. 105(8):2883-8.
41. **Chang CW, Lai YS, Pawlik KM, Liu K, Sun CW, Li C, Schoeb TR, Townes TM. (2009).** Polycistronic lentiviral vector for "hit and run"

reprogramming of adult skin fibroblasts to induced pluripotent stem cells. Stem Cells. 27(5):1042-9.

42. **Brown ME, Rondon E, Rajesh D, Mack A, Lewis R, Feng X, Zitur LJ, Learish RD, Nuwaysir EF. (2010).** Derivation of induced pluripotent stem cells from human peripheral blood T lymphocytes. PLoS One. 5(6):e11373.
43. **Jia F, Wilson KD, Sun N, Gupta DM, Huang M, Li Z, Panetta NJ, Chen ZY, Robbins RC, Kay MA, Longaker MT, Wu JC. (2010).** A nonviral minicircle vector for deriving human iPS cells. Nat Methods. 7(3):197-9.
44. **Sugii S, Kida Y, Berggren WT, Evans RM. (2011).** Feeder-dependent and feeder-independent iPS cell derivation from human and mouse adipose stem cells.Nat Protoc. 6(3):346-58.
45. **Sun N, Panetta NJ, Gupta DM, Wilson KD, Lee A, Jia F, Hu S, Cherry AM, Robbins RC, Longaker MT, Wu JC. (2009).** Feeder-free derivation of induced pluripotent stem cells from adult human adipose stem cells. Proc Natl Acad Sci U S A. 106(37):15720-5.
46. **Sheykhhasan M, Kalhor N, Tabatabaei Qomi S R, Ghiasi M. (2014).** Optimization method for isolation and culture of chondrocytes in human nasal cartilage tissue. International Journal of Advanced Biological Science and Engineering. 1(2): 74-85.
47. **Sheykhhasan M, Tabatabaei Qomi S R, Kalhor N, Ghiasi M. (2014).** Isolation and maintenance of canine Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells in order to tissue engineering application. International Journal of Advanced Biological Science and Engineering. 1(2): 86-97.
48. **Ghiasi M, Tabatabaei Qomi R, Kalhor N, Fazaeli H, Mehdizadeh M, Sheykhhasan M. (2014).** The Design of Scaffolds for Use in Tissue Engineering. SMU Medical Journal. 1(2):261-273.
49. **Kim JB, Zaehres H, Wu G, Gentile L, Ko K, Sebastiano V, Araúzo-Bravo MJ, Ruau D, Han DW, Zenke M, Schöler HR. (2008).** Pluripotent stem cells induced from adult neural stem cells by reprogramming with two factors. Nature. 454(7204):646-50.
50. **Sommer CA, Stadtfeld M, Murphy GJ, Hochedlinger K, Kotton DN, Mostoslavsky G. (2009).** Induced pluripotent stem cell generation using a single lentiviral stem cell cassette. Stem Cells. 27(3):543-9.
51. **Carey BW, Markoulaki S, Beard C, Hanna J, Jaenisch R. (2010).** Single-gene transgenic mouse strains for reprogramming adult somatic cells. Nat Methods. 7(1):56-9.
52. **Kaji K, Norrby K, Paca A, Mileikovsky M, Mohseni P, Woltjen K. (2009).** Virus-free induction of pluripotency and subsequent excision of reprogramming factors.Nature. 458(7239):771-5.
53. **Woltjen K, Michael IP, Mohseni P, Desai R, Mileikovsky M, Hämäläinen R, Cowling R, Wang W, Liu P, Gertsenstein M, Kaji K, Sung HK, Nagy A. (2009).** piggyBac transposition reprograms fibroblasts to induced pluripotent stem cells. Nature. 458(7239):766-70.

54. **Zhou H, Wu S, Joo JY, Zhu S, Han DW, Lin T, Trauger S, Bien G, Yao S, Zhu Y, Siuzdak G, Schöler HR, Duan L, Ding S. (2009).** Generation of induced pluripotent stem cells using recombinant proteins. Cell Stem Cell. 4(5):381-4.
55. **Kim D, Kim CH, Moon JI, Chung YG, Chang MY, Han BS, Ko S, Yang E, Cha KY, Lanza R, Kim KS. (2009).** Generation of human induced pluripotent stem cells by direct delivery of reprogramming proteins. Cell Stem Cell. 4(6):472-6.
56. **Zhou W, Freed CR. (2009).** Adenoviral gene delivery can reprogram human fibroblasts to induced pluripotent stem cells. Stem Cells. 27(11):2667-74.
57. **Fusaki N, Ban H, Nishiyama A, Saeki K, 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. Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci. 85(8):348-62.
58. **Okita K, Nakagawa M, Hyenjong H, Ichisaka T, Yamanaka S. (2008).** Generation of mouse induced pluripotent stem cells without viral vectors. Science. 322(5903):949-53.
59. **Gonzalez F, Barragan Monasterio M, Tiscornia G, Montserrat Pulido N, Vassena R, Batlle Morera L, Rodriguez Piza I, Izpisua Belmonte JC. (2009).** Generation of mouse-induced pluripotent stem cells by transient expression of a single nonviral polycistronic vector. Proc Natl Acad Sci U S A. 106(22):8918-22.
60. **Jia F, Wilson KD, Sun N, Gupta DM, Huang M, Li Z, Panetta NJ, Chen ZY, Robbins RC, Kay MA, Longaker MT, Wu JC. (2010).** A nonviral minicircle vector for deriving human iPS cells. Nat Methods. 7(3):197-9.
61. **Warren L, Manos PD, Ahfeldt T, Loh YH, Li H, Lau F, Ebina W, Mandal PK, Smith ZD, Meissner A, Daley GQ, Brack AS, Collins JJ, Cowan C, Schlaeger TM, Rossi DJ. (2010).** Highly efficient reprogramming to pluripotency and directed differentiation of human cells with synthetic modified mRNA. Cell Stem Cell. 7(5):618-30.
62. **Chen S, Zhang Q, Wu X, Schultz PG, Ding S. (2004).** Dedifferentiation of lineage-committed cells by a small molecule. J Am Chem Soc. 126(2):410-1.
63. **Shi Y, Desponts C, Do JT, Hahm HS, Schöler HR, 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):568-74.
64. **Shi Y, Do JT, Desponts C, Hahm HS, Schöler HR, Ding S. (2008).** A combined chemical and genetic approach for the generation of induced pluripotent stem cells. Cell Stem Cell. 2(6):525-8.
65. **Li W, Wei W, Zhu S, Zhu J, Shi Y, Lin T, Hao E, Hayek A, Deng H, Ding S. (2009).** Generation of rat and human induced pluripotent stem cells by combining genetic reprogramming and chemical inhibitors. Cell Stem Cell, 4(1):16-9.

66. **Lin SL, Chang DC, Chang-Lin S, Lin CH, Wu DT, Chen DT, Ying SY.(2008).** Mir-302 reprograms human skin cancer cells into a pluripotent ES-cell-like state, RNA. 14(10):2115-24.
67. **Fang R, Liu K, Zhao Y, Li H, Zhu D, Du Y, Xiang C, Li X, Liu H, Miao Z, Zhang X, Shi Y, Yang W, Xu J, Deng H. (2014).** Generation of naive induced pluripotent stem cells from rhesus monkey fibroblasts. Cell Stem Cell. 2;15 (4):488-96.
68. **Chu Z, Niu B, Zhu H, He X, Bai C, Li G, Hua J. (2015).** PRMT5 enhances generation of induced pluripotent stem cells from dairy goat embryonic fibroblasts via down-regulation of p53. Cell Prolif. Feb; 48 (1):29-38.