

ایجاد سلول‌های القایی پرتوان از سلول‌های بنیادی مزانشیمی ورید بند ناف انسان

مهرداد عبدی^۱، سونا زارع^۲، فریدین فتحی^۳، سید هادی انجم روز^۴، محمد جعفر رضایی^۴، جلال رستم‌زاده^۵

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد علوم تشریحی، گروه علوم تشریحی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کردستان، سنندج، ایران

۲. کارشناسی ارشد سلولی و مولکولی، گروه علوم زیستی و بیوتکنولوژی، دانشکده علوم، دانشگاه کردستان، سنندج، ایران

۳. استاد علوم تشریحی، مرکز تحقیقات علوم سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی کردستان، سنندج، ایران، (مؤلف مسؤول): تلفن ثابت: ۰۸۷۱-۶۱۳۱۳۷۷

farfath@gmail.com

۴. دانشیار علوم تشریحی، مرکز تحقیقات علوم سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی کردستان، سنندج، ایران

۵. استادیار ژنتیک، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه کردستان، سنندج، ایران

چکیده

زمینه و هدف: در این مطالعه کلنی‌هایی مشابه کلنی‌های متشکل از سلول‌های القایی پرتوان از سلول‌های بنیادی مزانشیمی ورید بند ناف انسان ایجاد شدند.

روش بررسی: در این مطالعه که از نوع تجربی بود با استفاده از آنزیم کلاژناز نوع ۴، سلول‌های بنیادی مزانشیمی از جدار ورید بند ناف استخراج و کشت داده شدند. این سلول‌ها در پاساژ ۵ با پلاسمید حاوی ژن‌های خودبازسازی سلول‌های بنیادی Oct4 و Sox2 به روش الکتروپوریشن ترانسفکت گردیدند. بعد از گذشت ۹ روز کلنی‌هایی شبیه به کلنی‌های سلول‌های پرتوان القایی ظاهر شدند. ماهیت سلول‌های مذکور از نظر بیان مارکرهای ویژه سلول‌های بنیادی جنینی با استفاده از ارزیابی‌های ایمونوسیتوشیمی و بررسی فعالیت آلکالین فسفاتاز بررسی شد.

یافته‌ها: ارزیابی‌های ایمونوسیتوشیمی حاکی از وجود مارکرهای پرتوانی مانند؛ SSEA4، TRA1-60، TRA1-81 و Oct4 و مثبت بودن فعالیت آلکالین فسفاتاز در کلنی‌های بدست آمده بود.

نتیجه‌گیری: نتایج این تحقیق نشان داد که بیان موقت ژن‌های خودبازسازی OCT4 و SOX2 منجر به ایجاد کلنی‌های مشابه کلنی‌های متشکل از سلول‌های پرتوان القایی از سلول‌های بنیادی مزانشیمی ورید بند ناف می‌شود.

کلید واژه‌ها: سلول‌های بنیادی القایی پرتوان، سلول‌های بنیادی مزانشیمی ورید بند ناف، بازبرنامه‌ریزی، ژن‌های خودبازسازی

وصول مقاله: ۹۲/۲/۲۳ اصلاحیه نهایی: ۹۲/۴/۳۰ پذیرش: ۹۲/۶/۳

مقدمه

سلول‌های بنیادی جنینی^۱ (ESCs)، سلول‌هایی هستند پرتوان^۲ که از توده سلول داخلی^۳ (ICM) و یا اپی‌بلاست بلاستوسیست‌ها مشتق می‌شوند. این سلول‌ها علاوه بر اینکه توان تمایزی خود را حفظ می‌کنند، می‌توانند به صورت نامحدود نیز تکثیر شوند (۱ و ۲). بازبرنامه‌ریزی هسته‌ای^۴، فرآیندی است که در آن سلول‌های تمایز یافته به حالت جنینی بازگردانده می‌شوند. تاکنون چندین استراتژی برای بازبرنامه‌ریزی هسته‌ای شناخته شده، که مهمترین آنها انتقال هسته^۵، ادغام سلولی^۶ و بازبرنامه‌ریزی با فاکتورهای رونویسی است (۳ و ۴). بازبرنامه‌ریزی هسته با فاکتورهای رونویسی، برای اولین بار توسط Takahashi و همکاران گزارش شد (۵). آنها چهار فاکتور رونویسی OCT4، SOX2، Klf4 و c-Myc را توسط وکتور ویروسی به داخل فیبروبلاست‌های جنینی موش انتقال دادند. حاصل این کار کلنی‌هایی بود که از نظر مورفولوژی و بیان ژن، شبیه سلول‌های بنیادی جنینی (ESC) بودند. پژوهشگران فوق این سلول‌ها را "سلول‌های پرتوان القایی"^۷ نام‌گذاری کردند (۵). سلول‌های پرتوان القایی (iPSc)، از لحاظ پتانسیل تمایزی، پرتوان می‌باشند و توانایی ایجاد موجود کایمر را دارند (۶). مطالعات اخیر حاکی از آن است که بعضی از این سلول‌ها، در صورتیکه به داخل بلاستوسیست تراپلوئید تزریق شوند، می‌توانند موجود کامل را ایجاد کنند (۷ و ۸). این سلول‌ها در سلول‌درمانی، ایجاد مدل بیماری‌های انسانی و ارزیابی داروهای جدید می‌توانند مورد استفاده قرار گیرند (۹ و ۱۰). گرچه تاکنون سلول‌های مختلف انسانی مانند کراتینوسیت‌ها، فیبروبلاست‌ها و سلول‌های بنیادی عصبی بازبرنامه‌ریزی شده‌اند، با این وجود محققین

کماکان در پی بهترین منبع سلولی برای بازبرنامه‌ریزی هستند (۱۱-۱۳). بررسی‌ها نشان داده که فاکتورهایی مانند نوع سلول، سن و منشأ آن در بازبرنامه‌ریزی تأثیر دارند (۱۴). تاکنون پروتکل‌های مختلفی برای بازبرنامه‌ریزی ارائه گردیده، ولی پروتکلی مطلوب است که علاوه بر موارد ذکر شده، پارامترهایی مانند زمان بازبرنامه‌ریزی و تعداد فاکتورهای رونویسی را نیز مد نظر قرار داده باشد (۱۵). اکثر مطالعات در زمینه سلول‌های پرتوان القایی، توسط وکتورهای ویروسی صورت گرفته است. با اینکه کارایی باز برنامه‌ریزی با این وکتورها بالاست ولی ادغام^۸ توالی ویروسی آنها در ژنوم میزبان احتمال ایجاد تومور و نقائص ژنتیکی را بالا برده است (۱۶ و ۱۷). از جمله وکتورهایی که بیش از همه توجه محققین را به خود جلب کرده، پلاسمیدها^۹ می‌باشند. پلاسمیدها نسبت به ویروسها امکان درج درون ژنومشان کمتر می‌باشد؛ ولی عیب بزرگ این وکتورها، بیان ناپایدار و گذرای آنها می‌باشد که این موضوع بازدهی آنها را در ایجاد سلول‌های پرتوان القایی به شدت پایین آورده است (۱۸). سلول‌های بنیادی مزانشیمی^{۱۰} (MSCs) سلول‌های چند توانی^{۱۱} هستند که در اغلب بافت‌های بزرگسالان مانند کبد، مغز استخوان و بافت چربی یافت می‌شوند. این سلولها توانایی مهاجرت به نواحی آسیب دیده و شرکت در ترمیم ضایعه را دارند (۱۹ و ۲۰). بند ناف انسان یک منبع غنی از سلول‌های بنیادی مزانشیمی می‌باشد. مطالعات نشان داده که این سلول‌ها را می‌توان از ماتریکس، خون و ورید بند ناف استخراج کرد (۲۱). پتانسیل تمایزی سلول‌های چند توان در مقایسه با سلول‌های پرتوان کمتر بوده و فقط به تعداد محدودی از سلول‌های سازنده بدن تبدیل می‌شوند؛ در حالیکه تمامی سلول‌های سازنده بدن را می‌توان از سلول‌های پرتوان ایجاد کرد. لذا در این مطالعه از سلول‌های

¹ Embryonic Stem Cells² Pluripotent³ Inner Cell Mass⁴ Nuclear Reprogramming⁵ Nuclear transferring⁶ Cell Fusion⁷ Induced pluripotent stem cells⁸ Integration⁹ Plasmid¹⁰ Mesenchymal stem cells¹¹ Multipotent

فلاسک را پر کرده بودند توسط تریپسین ۰/۰۵٪^{۱۹} از کف فلاسک جدا شده و با دور 1000rpm سانتریوفیوژ شدند. بعد از اتمام سانتریوفیوژ، محیط رویی سلول ها برداشته شده و سلول ها در 790µl بافر هایپواسمولار^{۲۰} به حالت سوسپانسیون درآمدند. سلول های مزانشیمی همراه با بافر به کووت^{۲۱} مخصوص الکتروپوریشن منتقل شده و به آنها 15 µg pSIN4-EF2-O2S در حجم ۱۰ میکرولیتر اضافه شد. بعد از سه بار پیپتاژ آرام، سوسپانسیون سلولی به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق قرار داده شد. بعد از ۱۰ دقیقه، کووت در دستگاه مولتی پوریتور^{۲۲} قرار داده شده و یک پالس با ولتاژ 600 v و زمان پالس 100 µs به سلولها اعمال شد. بعد از اعمال پالس، سلولها دوباره ۱۰ دقیقه در دمای اتاق گذاشته شدند، سپس به آرامی به فلاسک حاوی محیط کشت سلول های مزانشیمی بند ناف منتقل شدند.

ارزیابی ایمونوسیتوشیمی

سلولهای بدست آمده باید مارکرهای سلول های بنیادی جنینی انسانی را بیان کنند. از جمله مارکرهایی پرتوانی^{۲۳} TRA1-81, TRA1-60, SSEA4, OCT4 می باشند. برای ارزیابی ایمونوسیتوشیمی از پلیت های ۹۶ چاهکی استفاده شد. سلولها ابتدا با بافر فسفات^{۲۴} PBS، شستشو داده شده و سپس با پارافرمالدهید ۰/۴٪ به مدت ۲۰ دقیقه ثابت شدند. بعد از ۲۰ دقیقه پارافرمالدهید برداشته شده و دو بار به مدت ۱۰ دقیقه با بافر فسفات شستشو داده شدند، در مورد OCT4، تراوایی سلولها قبل از شستشو، با اضافه کردن محلول بافر فسفات حاوی تریتون X ۰/۱٪، افزایش داده شد. بعد از شستشو، محلول مسدود کننده به مدت ۳۰ دقیقه به چاهک حاوی سلولها اضافه شد. محلول مسدود کننده

بنیادی مزانشیمی ورید بند ناف (hUCV-MSC^{۱۲}) به عنوان یکی از منابع سلولهای مزانشیمی و چند توان جهت ایجاد سلولهای پرتوان القایی iPSc استفاده شد و سلولهای حاصله از جنبه های سلولی و مولکولی ارزیابی شدند.

روش بررسی

جداسازی و کشت سلول های بنیادی مزانشیمی از ورید بند ناف انسان

در این مطالعه که از نوع تجربی بود، بند ناف نوزادان تازه متولد شده از بیمارستان بعثت سنندج تهیه شد و درون بافر HBSS^{۱۳} حاوی پنی سیلین-استرپتومایسین و فانگیزون^{۱۴} (جهت جلوگیری از رشد عوامل میکروبی و قارچی) به آزمایشگاه منتقل گردید. در آزمایشگاه ابتدا با بافر HBSS بند ناف شستشو داده شده و سپس ورید آن به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه تحت تیمار با آنزیم کلاژناز ۴ قرار گرفت. در مرحله بعد ورید با محیط DMDEM^{۱۵} low glucose سرم دار شستشو داده شد. سوسپانسیون سلولی بدست آمده سانتریوفیوژ گردید. به رسوب سلولی بدست آمده از مرحله قبل ۵ سی سی محیط DMEM low glucose، حاوی ۱۵٪ FBS^{۱۶}، EGF^{۱۷} و bFGF^{۱۸} اضافه شده و بعد از چند پیپتاژ آرام سوسپانسیون سلولی به فلاسک های T25 منتقل شد. بعد از گذشت ۴۸ ساعت محیط کشت سلولها تعویض شد (۲۲).

الکتروپوریشن سلول های بنیادی مزانشیمی ورید بند ناف با پلاسمید حامل ژنهای OCT4 و SOX2

سلول های بنیادی مزانشیمی ورید بند ناف تا پاساژ ۵ کشت داده شدند. در پاساژ ۵ زمانی که سلولها حدود ۸۰٪ کف

¹² Human Umbilical Cord Vein – Mesenchymal Stem Cell

¹³ Hanks Balanced Salt Solution

¹⁴ Fungizone

¹⁵ Dulbico modified eagle medium

¹⁶ Fetal bovine serum

¹⁷ Epidermal Growth Factor

¹⁸ Basic Fibroblast Growth Factor

¹⁹ Trypsin - EDTA

²⁰ Hypoosmolar buffer

²¹ Cuvette

²² Multiporator (eppendorf Germany)

²³ Stage Specific Embryonic Antigen

²⁴ Phosphate Buffered Saline

سلولهای در پاساژ ۵ برای ترانسفکشن استفاده شد. بعد از ترنسفکت کردن سلولها با پلاسمید pSIN4-EF2-O2S ، به محیط کشت مخصوص خود در پلیت های ۱۲ چاهکی منتقل شدند. سلولها در روز پنجم ترپسینه شده و بر روی سلولهای فیبروبلاست جنینی^{۲۶} (MEF) بعنوان لایه تغذیه کننده ، که با استفاده از مایتومايسين^{۲۷} تقسیم میتوز در آنها متوقف شده بود ، منتقل شدند. تعویض محیط سلولها به فاصله یک روز در میان به همراه تیمار با والپوریک اسید^{۲۸} با غلظت یک میلی مولار انجام گرفت. کلنی های سلولهای پرتوان القائی از حدود روز نهم ظاهر شدند(شکل- ۲). کلنی های بدست آمده ظاهری صاف با حاشیه ی روشن داشتند. بر روی کلنی های بدست آمده ارزیابی ایمنوسیتوشیمی، صورت گرفت. در ارزیابی ایمنوسیتوشیمی حضور مارکرهای پرتوانی SSEA4، TRA1-60، TRA1-81 و OCT4 در کلنیها مشاهده شد (شکل ۳). همچنین جهت اطمینان بیشتر از کلنی های بدست آمده، بر روی آنها ارزیابی آلکالین فسفاتاز صورت گرفت. یافته های بدست آمده حاکی از وجود این آنزیم در سلول های بدست آمده بود(شکل ۴). نتایج این مطالعه در سه آزمایش متوالی یکسان بود.

تخلیه شد و به هر چاهک یکی از آنتی بادیهای اولیه بر علیه OCT4، TRA1-81، TRA1-60، SSEA4 به مدت ۱ ساعت اضافه شد. محلول آنتی بادی اولیه برداشته شده و بعد از شستشو به چاهک مربوطه آنتی بادی ثانویه به مدت ۴۵ دقیقه اضافه شد. در نهایت سلولها بعد از شستشو، با میکروسکوپ فلوروسنت بررسی شدند. لازم به ذکر است که در این روش از سلول های NT2 که مارکرهای مذکور را بیان می کنند ، به عنوان کنترل مثبت سلولهای بنیادی جنینی انسانی استفاده شد.

ارزیابی آلکالین فسفاتاز

یکی دیگر از مارکرهای پرتوانی وجود آنزیم آلکالین فسفاتاز در سلول های پرتوان می باشد. برای ارزیابی آلکالین فسفاتاز از کیت شرکت میلی پور^{۲۵}، استفاده شد. ابتدا سلول های iPS با محلول پارافمالدهید ۴٪ ثابت شده و سپس بر طبق پروتوکل همراه کیت مخلوطی از Fast red ، Naphthol violet و آب به نسبت ۱:۱:۲ به چاهکها اضافه شد و به مدت ۱۵ دقیقه در تاریکی انکوبه شدند. سپس محلول فوق را برداشته ، سلولها را با PBS شستشو داده و با استفاده از میکروسکوپ ارزیابی و عکسبرداری شدند.

نتایج

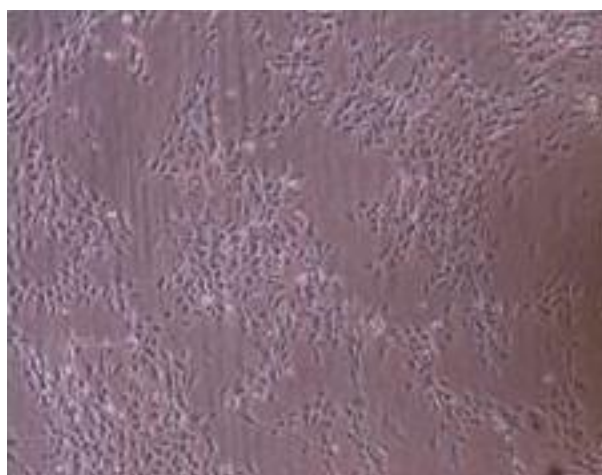
سلول های بنیادی مزانشیمی ورید بند ناف انسان، ۴۸ ساعت بعد از استخراج تعویض محیط شدند. سلول های مزانشیمی در ابتدا به صورت کلنیهای سلولی کوچکی دیده شدند. بتدریج با گذشت حدود ۷ روز سلولهای دوکی شکل با مشخصه سلولهای مزانشیمی حدود ۸۰ تا ۹۰ درصد از کف فلاسک را پر کردند(شکل ۱). از آنجائیکه بهتر است سلولها قبل از الکتروپوریشن پاساژ داده شوند و نیز به منظور حذف سلولهای ناخواسته در محیط کشت ، از

²⁶ Mouse Embryonic Fibroblast

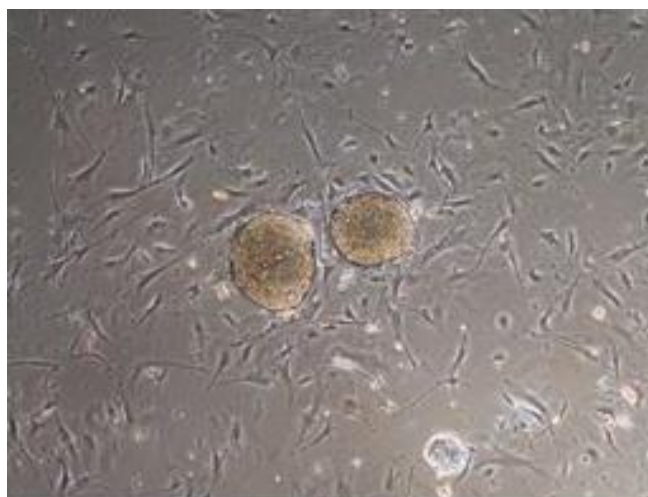
²⁷ Mitomycin

²⁸ Valporic acid

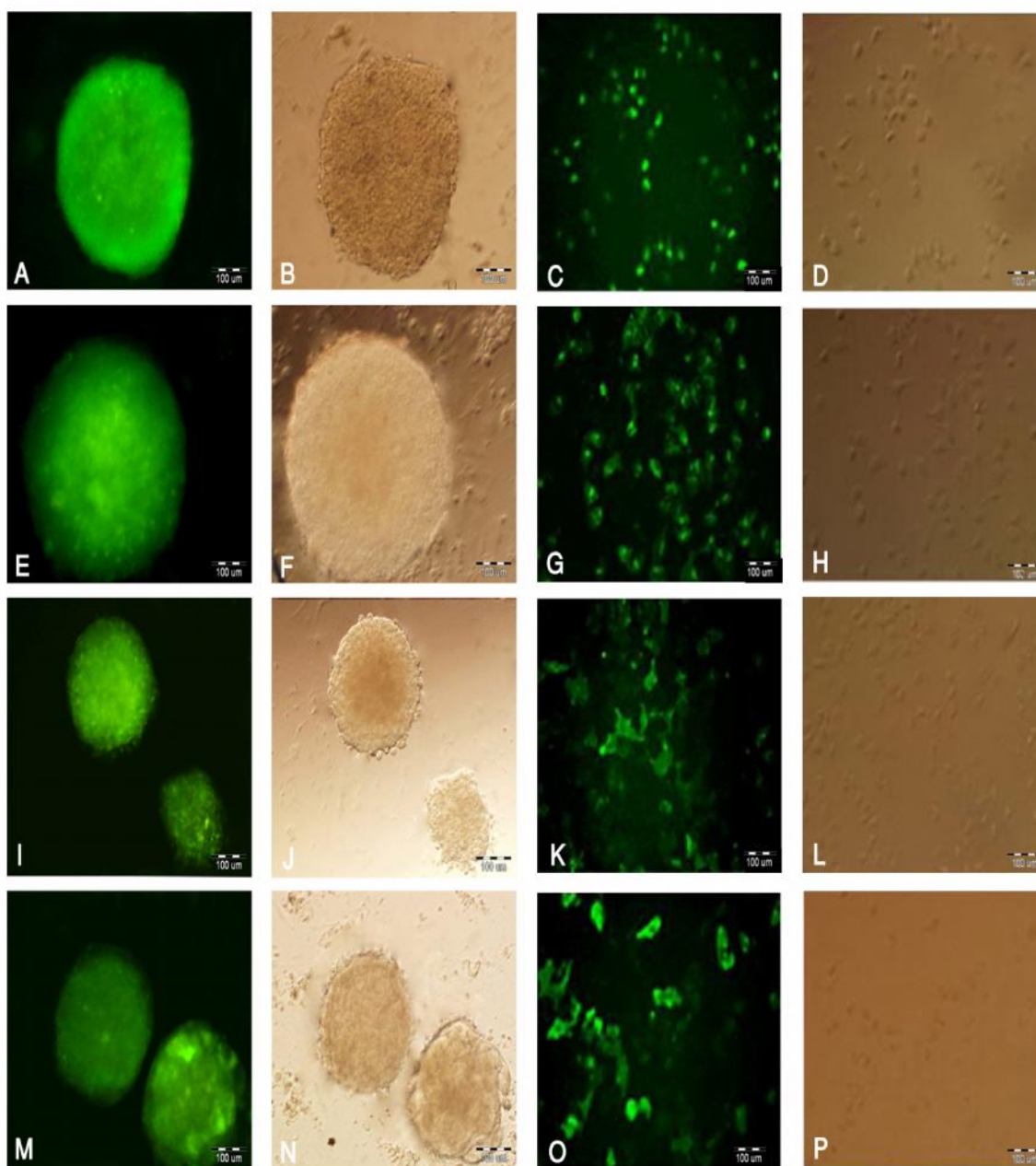
²⁵ millipore



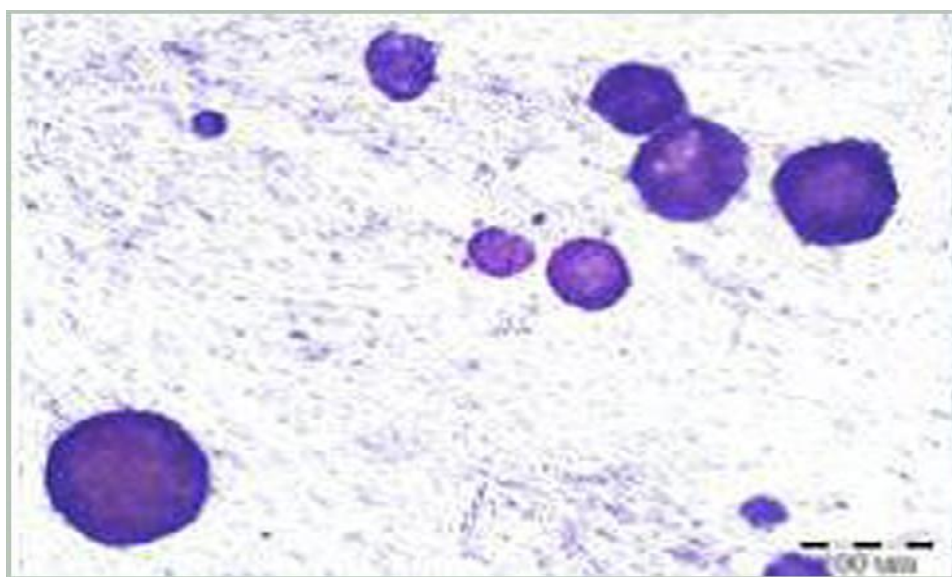
شکل ۱: سلول های بنیادی مزانشیمی ورید بند ناف انسان ۴۸ ساعت بعد از استخراج بزرگنمایی ۴۰×



شکل ۲: کلنی های تشکیل شده از سلولهای مزانشیمی ورید بند ناف که بدنبال بیان موقت ژنهای دو فاکتور رونویسی Sox-2 و Oct-4 در روز ۹ تشکیل شده اند بزرگنمایی ۱۰۰×.



شکل ۳: واکنش مثبت کلنی‌های متشکل از سلولهای پرتوان القائی منشاء گرفته از سلولهای مزانشیمی ورید بند ناف انسانی به ارزیابی ایمونوفلورسنت انجام شده برای مارکرهای ویژه سلولهای بنیادی جنینی انسانی: Oct4 (A), SSEA4(E&F), TRA1-60 (I) و TRA1-80(M). تصاویر O,K,G,C مربوط به بیان آنتی ژنهای مذکور در سلولهای NT2 است که بعنوان کنترل مثبت استفاده شدند. در سمت راست هر تصویر فلورسنت تصاویر فاز کنتراست سلولهای پرتوان (N,J,F,B) یا سلولهای NT2 (P,L,H,D) دیده می‌شوند.



شکل ۴: بررسی بیان آنزیم آلکالین فسفاتاز در کلنی های سلولهای پرتوان القایی منشاء گرفته از سلولهای مزانشیمی ورید بند ناف انسانی. بزرگنمایی ۱۰۰×

بحث

در این مطالعه با استفاده از بیان موقت دو فاکتور رونویسی Oct4 و Sox2 سلولهای بنیادی مزانشیمی بند ناف به سلولهای پرتوان القایی باز برنامه ریزی شدند و ماهیت آنها با انجام ارزیابی ایمونوسیتوفلورسنت تایید شد. سلولهای پرتوان القایی (iPS cells) ابزاری با ارزش برای مطالعه‌ی مکانیسم‌های مولکولی تکامل موجودات و نحوه ایجاد بیماری محسوب می شوند. تولید این سلول‌ها زمانی اهمیت پیدا می کند که عملاً در درمان بیماریها کار برد پیدا کنند. از جمله اهداف محققان علم بیولوژی در عصر حاضر ایجاد سلولهای پرتوان القایی عاری از ژن خارجی است. از سه روش می توان برای ایجاد سلولهای پرتوان القایی عاری از ترانسژن استفاده کرد. یکی از این روشها به کار بردن وکتورهایی است که وارد ژنوم میزبان نمی شوند. روش دوم بکارگیری وکتورهایی است که وارد ژنوم میزبان می شوند ولی بعداً حذف می شوند. همچنین استفاده از وکتورهایی غیر از نوکلئیک اسیدها نیز مورد توجه واقع شده است (۲۳ و ۲۴). اولین سلولهای پرتوان القایی بدون ادغام ژنی از سلولهای هپاتوسیت موش بالغ با استفاده از وکتور

آدنوویروسی و سلولهای فیروبلاست جنینی موش با بکارگیری وکتور پلاسمیدی بدست آمدند (۲۵). مطالعات فوق این ایده را مطرح کرد که بیان گذرای فاکتورهای رونویسی ویژه خودبازسازی برای بازبرنامه ریزی کافی است. استفاده از وکتورهایی که درون ژنوم میزبان ادغام نمی شوند به شدت بازده بازبرنامه ریزی را پایین می آورد، علت این امر آن است که بیان فاکتورهای فوق به حدی نیست که تغییرات اپی ژنتیکی لازم برای بازبرنامه ریزی را موجب شود. یکی از ابزارهای مهم در ایجاد سلولهای پرتوان القایی تعداد فاکتورهای رونویسی مورد استفاده در بازبرنامه ریزی هسته‌ای می باشند. تاکنون مطالعات متعددی با استفاده از فاکتورهای رونویسی مختلف صورت گرفته است. اولین بار Okita و همکاران موفق به بازبرنامه ریزی سلولهای MEF با چهار فاکتور رونویسی توسط وکتور پلاسمیدی شدند. پژوهشگران فوق سلولهای فیروبلاست جنینی موش را با پلاسمید حاوی فاکتورهای رونویسی klf4, SOX2, OCT4 و cMyc ترانسفکت کردند. حاصل کار کلنی‌هایی شبیه سلولهای بنیادی جنینی موش بودند (۲۶). انتظار می‌رود سلولهای بنیادی بالغ که چند توان یا

در مطالعه‌ای دیگر سلول‌های بنیادی چربی انسانی با استفاده از وکتور پلاسمیدی حاوی فاکتورهای رونویسی OCT4، SOX2، klf4، و cMyc به سلول‌های پرتوان القایی بازبرنامه‌ریزی شدند. در مطالعه مذکور هم از والپوریک اسید جهت افزایش کارایی بازبرنامه‌ریزی در سلولها استفاده نشد (۲۹).

در یک مطالعه دیگر با استفاده از رتروویروس سلول‌های بنیادی خون بند ناف توسط فاکتورهای رونویسی OCT4 و SOX2 به کلنی‌های متشکل از سلول‌های پرتوان القایی تبدیل شدند (۳۰). مطالعات فوق و به‌مراه سایر مطالعات (۱۳ و ۶) نشان می‌دهند که ژن OCT4 بالا دستی‌ترین ژن و اصلی‌ترین عامل در شبکه ارتباطی مولکولی لازم جهت ایجاد حالت پرتوانی سلولهای بنیادی می‌باشد و سایر عوامل باعث تسریع و افزایش بازده بازبرنامه‌ریزی می‌شوند. نتایج مطالعات انجام گرفته قبلی نشان می‌دهند که بعضی از ترکیبات شیمیایی در فرآیند بازبرنامه‌ریزی تاثیر گذار هستند. تیمار سلول‌های فیبروبلاست جنینی با 5-azacytidine و dexamethasone، بازده بازبرنامه‌ریزی را ۲۵ برابر افزایش می‌دهد. تیمار سلول‌های فیبروبلاست جنینی با والپوریک اسید که یک بازدارنده هیستون داستیلاز است، کارایی بازبرنامه‌ریزی را ۱۰۰ برابر می‌کند (۳۱). در این مطالعه هم اگرچه از والپوریک اسید برای افزایش بازبرنامه‌ریزی سلولها استفاده شد اما ارزیابی کمی جهت بررسی میزان تاثیر آن صورت نگرفت.

نتیجه‌گیری

از نتایج بدست آمده از این مطالعه می‌توان نتیجه گرفت که احتمالاً بیان موقت دو فاکتور رونویسی Oct4 و Sox2 جهت بازبرنامه‌ریزی سلولهای بنیادی مزانشیمی ورید بند ناف کافی می‌باشد که این می‌تواند به دلیل بالا بودن پتانسیل باز برنامه‌ریزی سلولهای مذکور بعنوان نمونه ای از سلولهای بنیادی بالغ باشد. در دسترس بودن سلولهای مزانشیمی ورید بند ناف اهمیت آنها را جهت بکارگیری در

چند استعدادی هستند با بیان تعداد کمتری از فاکتورهای رونویسی تبدیل به سلولهای پرتوان القایی شوند. اگرچه تاکنون در خصوص بازبرنامه‌ریزی سلولهای مزانشیمی جدار ورید بند ناف گزارشی ارائه نشده است که بتوان از طریق مقایسه با آن، نتایج این مطالعه را مورد بحث قرار داد، اما گزارشهایی از باز برنامه‌ریزی سلولهای بنیادی بالغ وجود دارد که از جهات مختلف قابل مقایسه با مطالعه حاضر هستند. در سال ۲۰۰۹، Hester و همکاران، سلول‌های بنیادی عصبی انسانی را بعنوان یکی از انواع سلولهای بنیادی بالغ با وکتور رتروویروسی حاوی دو فاکتور رونویسی OCT4 و Klf4 به سلول‌های پرتوان القایی تبدیل کردند. در مطالعه ما هم از دو فاکتور رونویسی استفاده شد اما جهت افزایش کارایی بازبرنامه‌ریزی سلولهای مورد مطالعه با استفاده از پلاسمید از والپوریک اسید استفاده شد. در مطالعه Hester و همکاران از والپوریک اسید استفاده نشد که این مسئله احتمالاً می‌تواند به دلیل بالاتر بودن کارایی ترانسفکشن و بازبرنامه‌ریزی سلولها با استفاده از ویروس باشد. از نقطه نظر اهمیت سلولهای مورد استفاده در دو مطالعه مورد مقایسه، می‌توان به محدودیت دسترسی به سلولهای بنیادی عصبی انسان در مقایسه با سلولهای بند ناف و نیز ویژگی استفاده از وکتورهای پلاسمیدی بعنوان وکتورهای فاقد توالی ویروسی اشاره کرد که بعد از ادغام در ژنوم سلولهای باز برنامه‌ریزی شده می‌توانند منبع بالقوه ای از مشکلات ناشی از توالی ویروسی باشند (۲۷).

در سال ۲۰۱۳، Okita و همکاران موفق به بازبرنامه‌ریزی سلول‌های بنیادی بالغ هماتوپویتیک خون بند ناف انسان با استفاده از وکتور اپی‌زومال، بعنوان وکتورهای ویروسی که قابل ادغام در ژنوم نیستند، شدند. وکتور مورد استفاده آنها حاوی شش فاکتور رونویسی OCT4، SOX2، KLF4، Line28، c-MYC و TP53 بود. این گروه از محققین هم همانند گروه قبلی از والپوریک اسید استفاده نکردند اما در مقایسه با مطالعه حاضر تعداد بیشتری از فاکتورهای رونویسی را به داخل سلولها منتقل کردند (۲۸).

تشکر و قدردانی

بودجه این تحقیق که حاصل یک پایان نامه کارشناسی ارشد است از محل اعتبارات پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی کردستان تأمین شده است که بدینوسیله قدردانی می شود.

مطالعات سلول درمانی افزایش می دهد. انجام بررسیهای بیشتر جهت ارزیابی دقیقتر کلیه های بدست آمده و نیز تهیه رده سلولی نامیرا، بعنوان سلولهای پرتوان القایی، از آنها، ضروری است بگونه ای سلولهای پرتوان حاصله قادر باشند به سلولهای مختلف سازنده بدن از جمله سلولهای کبدی، قلبی و عصبی تبدیل شوند.

Reference

- 1.Young RA. Control of the Embryonic Stem Cell State. *Cell*. 2011;144:940-54.
- 2.Orkin SH, Hochedlinger K. Chromatin Connections to Pluripotency and Cellular Reprogramming. *Cell*. 2011;145:835-50.
- 3.Yamanaka S, Blau HM. Nuclear reprogramming to a pluripotent state by three approaches. *Nature*. 2010;465:704-12.
- 4.Pasque V, Jullien J, Miyamoto K, Halley-Stott RP, Gurdon JB. Epigenetic factors influencing resistance to nuclear reprogramming. *Trends Genet*. 2011;27:516-25.
- 5.Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*. 2006;126:663-76.
- 6.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;26:1269-75.
- 7.Kang L, Wang J, Zhang Y, Kou Z, Gao S. iPS cells can support full-term development of tetraploid blastocyst-complemented embryos. *Cell stem cell*. 2009;5:135-8.
- 8.Zhao XY, Li W, Lv Z, Liu L, Tong M, Hai T, et al. iPS cells produce viable mice through tetraploid complementation. *Nature*. 2009;461:86-90.
- 9.Gurdon JB, Melton DA. Nuclear reprogramming in cells. *Science*. 2008;322:1811-5.
- 10.Amabile G, Meissner A. Induced pluripotent stem cells: current progress and potential for regenerative medicine. *Trends in molecular medicine*. 2009;15:59-68.
- 11.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;131:861-72.
- 12.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;26:1276-84.
- 13.Kim JB, Greber B, Arauzo-Bravo MJ, Meyer J, Park KI, Zaehres H, et al. Direct reprogramming of human neural stem cells by OCT4. *Nature*. 2009;461:649-3.
- 14.Eminli S, Utikal J, Arnold K, Jaenisch R, Hochedlinger K. Reprogramming of neural progenitor cells into induced pluripotent stem cells in the absence of exogenous Sox2 expression. *Stem Cells*. 2008;26:2467-74.
- 15.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;454:646-50.
- 16.Aoi T, Yae K, Nakagawa M, Ichisaka T, Okita K, Takahashi K, et al. Generation of pluripotent stem cells from adult mouse liver and stomach cells. *Science*. 2008;321:699-702.

17. 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;448:318-24.
18. 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;458:771-5.
19. Wagner W, Wein F, Seckinger A, Frankhauser M, Wirkner U, Krause U, et al. Comparative characteristics of mesenchymal stem cells from human bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord blood. *Experimental hematology*. 2005;33:1402-16.
20. Hou LL, Zheng M, Wang DM, Yuan HF, Li HM, Chen L, et al. [Migration and differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells in the rat brain]. *Sheng li xue bao : [Acta physiologica Sinica]*. 2003;55:153-9.
21. Secco M, Zucconi E, Vieira NM, Fogaca LL, Cerqueira A, Carvalho MD, et al. Multipotent stem cells from umbilical cord: cord is richer than blood Stem Cells. *Stem Cells*. 2008;26:146-50.
22. Kermani AJ, Fathi F, Mowla SJ. Characterization and genetic manipulation of human umbilical cord vein mesenchymal stem cells: potential application in cell-based gene therapy. *Rejuvenation research*. 2008;11:379-86.
23. Soldner F, Hockemeyer D, Beard C, Gao Q, Bell GW, Cook EG, et al. Parkinson's disease patient-derived induced pluripotent stem cells free of viral reprogramming factors. *Cell*. 2009;136:964-77.
24. Shao LJ, Wu WS. Gene-delivery systems for iPS cell generation. *Expert Opin Biol Th*. 2010;10:231-42.
25. Stadtfeld M, Nagaya M, Utikal J, Weir G, Hochedlinger K. Induced Pluripotent Stem Cells Generated Without Viral Integration. *Science*. 2008;322:945-9.
26. Okita K, Nakagawa M, Hyenjong H, Ichisaka T, Yamanaka S. Generation of mouse induced pluripotent stem cells without viral vectors. *Science*. 2008;322:949-53..
27. Hester ME, Song S, Miranda CJ, Eagle A, Schwartz PH, Kaspar BK. Two factor reprogramming of human neural stem cells into pluripotency. *PloS one*. 2009;4:e7044.
28. Okita K, Yamakawa T, Matsumura Y, Sato Y, Amano N, Watanabe A, et al. An efficient nonviral method to generate integration-free human-induced pluripotent stem cells from cord blood and peripheral blood cells. *Stem Cells*. 2013;31:458-66.
29. Qu X, Liu T, Song K, Li X, Ge D. Induced pluripotent stem cells generated from human adipose-derived stem cells using a non-viral polycistronic plasmid in feeder-free conditions. *PloS one*. 2012;7:e48161.
30. Giorgetti A, Montserrat N, Aasen T, Gonzalez F, Rodriguez-Piza I, Vassena R, et al. Generation of induced pluripotent stem cells from human cord blood using OCT4 and SOX2. *Cell stem cell*. 2009;5:353-7.
31. Huangfu DW, Maehr R, Guo WJ, Eijkelenboom A, Snitow M, Chen AE, et al. Induction of pluripotent stem cells by defined factors is greatly improved by small-molecule compounds. *Nat Biotechnol*. 2008;26:795-7.