



## تولید سلول‌های رده هماتوپوئیک انسانی از سلول‌های شبه جنینی

غلامرضا خمیسی پور<sup>۱</sup>، علی اکبر پورفتح‌اله<sup>۲\*</sup>، مسعود سلیمانی<sup>۳</sup>، مهدی فروزنده‌مقدم<sup>۴</sup>،

مهرداد نوروزی‌نیا<sup>۵</sup>، سعید کاویانی<sup>۳</sup>، کامران علی‌مقدم<sup>۶</sup>، غلامرضا حیدری<sup>۷</sup>،

حمیدرضا علیزاده اطاقور<sup>۸</sup>

<sup>۱</sup> گروه علوم آزمایشگاهی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی بوشهر

<sup>۲</sup> گروه ایمنی‌شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس

<sup>۳</sup> گروه خون‌شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس

<sup>۴</sup> گروه بیوتکنولوژی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس

<sup>۵</sup> گروه ژنتیک پزشکی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس

<sup>۶</sup> گروه خون و انکولوژی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران

<sup>۷</sup> مرکز تحقیقات طب گرمسیری و عفونی خلیج فارس، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی بوشهر

<sup>۸</sup> گروه جراحی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی بوشهر

(دریافت مقاله: ۹۰/۸/۱۷ - پذیرش مقاله: ۹۱/۱/۲۳)

### چکیده

زمینه: تبدیل اپی‌ژنتیکی سلول‌های سوماتیک مختص بیمار به سلول‌های رویانی به دلیل اهمیت آن در پیوند سلول‌های بنیادی و سازگاری با گیرنده ارزش بسیاری برخوردار است. با این حال، به‌کارگیری درمانی سلول‌های به‌دست آمده به دلیل مشکلات فنی و موضوعات اخلاقی امکان‌پذیر نیست. اخیراً روش‌های جدیدی مطرح شده که با بیان اکتوپیک فاکتورهای رونویسی دوره رویانی سلول سوماتیک را به سلول شبه رویانی تبدیل کرده‌اند. محدودیت این روش به‌کارگیری ویروس‌های جهش‌زای آسیب-رسان به ژنوم مانند ترروویروس یالنتی ویروس می‌باشد. هدف اصلی این بررسی تولید سلول‌های بنیادی هماتوپوئیک انسانی از سلول‌های فیبروبلاست القا شده با وکتورهای بی‌خطر آدنوویروسی حامل ژن‌های فعال دوره رویانی بود.

مواد و روش‌ها: فیبروبلاست‌های جدا شده از پوست ختنه‌گاه تکثیر و آدنو ویروس‌های نو ترکیب حامل ژن‌های *Klf4*، *cMyc*، *Sox2*، *Oct4* انسانی به محیط کشت اضافه گردید. پس از تشکیل کلون‌های شبه جنینی و تکثیر سلولی به محیط کشت جنینی بدون *bFGF* منتقل و اجسام شبه رویانی در محیط تمایزی با و بدون استروما به مدت ۱۴ روز کشت داده شدند. یافته‌ها: بیان ژن *CD34* و شاخص‌های آنتی‌ژنی *CD38*، *CD34*، *CD133* در محیط تمایزی استرومایی اختلاف معنی‌داری با محیط غیرتمایزی و بدون استروما داشتند.

نتیجه‌گیری: این یافته‌ها نشان می‌دهند میزان تمایز هماتوپوئیک سلول‌های *Adeno-iPS* در محیط استرومایی زیاد است و نیازی به استفاده از فاکتور رشد نیست، در حالی که در تمایز هماتوپوئیک در محیط غیر تمایزی و تمایزی بدون استروما هیچ تفاوتی دیده نمی‌شود.

واژگان کلیدی: آدنوویروس، *iPS*، تمایز، هماتوپوئیک

\* تهران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده پزشکی، گروه ایمنی‌شناسی

## مقدمه

قابل انجام با وفور بالاست؛ با این‌حال، در بیماری‌های بدخیم خونی دارای محدودیت فنی برای پاکسازی سلول‌های بدخیم است و از سوی دیگر امکان تصحیح ژنتیکی در سلول‌های هماتوپوئیک و سایر سلول‌های بنیادی بالغ با روش‌های ژن درمانی ایمن مانند نوترکیبی همولوگ تقریباً وجود ندارد. ولی استفاده از این تکنیک در سلول‌های رویانی ممکن است (۶ و ۷).

در سال‌های اخیر، دانشمندان با استفاده از وکتورهای ویروسی حامل ژن‌های دوره رویانی شامل ژن‌های *Klf4*، *Oct4*، *Sox2* و *cMyc* و در سلول‌های سوماتیک توانستند سلول‌هایی با رفتار مشابه جنینی تولید کنند که به سلول‌های هر سه لایه جنینی قابل تمایز بوده و به‌همین دلیل سلول‌های پرتوان القایی یا سلول‌های *iPS* (Induced Pluripotent Stem Cells) نامیده شدند (۸-۱۰). با تولید این سلول‌ها، امکان تکثیر نامحدود، اصلاح ژنتیکی، و تمایز و تولید انواع سلول‌ها از جمله سلول‌های رده هماتوپوئیک مختص بیمار میسر شد (۱۱-۱۳). از آنجا که وکتورهای ویروسی مورد استفاده در بررسی‌های فوق از نوع رتروویروسی و لنتی ویروسی بودند که در ژنوم میزبان ادغام شده و موجب بیان نابجا و کنترل نشده و بروز بیماری‌های بدخیم می‌شوند (۱۴)، در بررسی کنونی برای القای تمایززدایی در سلول‌های سوماتیک فیبروبلاستی و تولید سلول‌های شبه جنینی *iPS* از وکتورهای آدنوویروسی نسل دوم استفاده شد که بخشی از ژنوم ویروس حذف شده است که قادر به تبدیل شدن به ویروس کامل به‌صورت مستقل نیستند. هم‌چنین بیان ژن مورد

پژوهش‌ها بر روی سلول‌های بنیادی چندظرفیتی حدوداً سه دهه پیش با کشف سلول‌های بنیادی رویانی موشی (mECSs) آغاز شد، که قادر به تمایز به هر یک از بافت‌های بدن موش بالغ بودند (۱).

از آن پس بررسی‌های بسیاری در مورد سلول‌های بنیادی رویانی با منشا انسانی (hECSs) صورت گرفته است که نشان دادند این سلول‌ها به همه انواع سلول‌های خونی تبدیل می‌شوند (۲ و ۳).

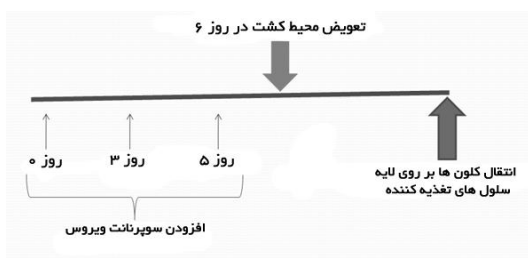
بهترین روش درمانی بسیاری از بیماری‌های ژنتیکی از جمله سرطان‌های خون، نقایص ایمنی و بیماری‌های ذخیره‌ای با استفاده از پیوند سلول‌های هماتوپوئیک با HLA سازگار است و پیوند سلول‌های هماتوپوئیک رایج‌ترین درمان متکی بر سلول است (۴).

هم‌اکنون سلول‌های بنیادی سوماتیک حاصل از مغز استخوان، بندناف و اخیراً خون محیطی تنها منابع سلول‌های قابل پیوند موجود جهت بازیابی بالینی توان هماتوپوئیک می‌باشند، اما دسترسی به آن‌ها محدود بوده و تنها یک سوم از بیماران اهداکننده خویشاوند سازگار دارند؛ به‌علاوه، شمار ناکافی سلول‌ها یکی از محدودیت‌های عمده بهره‌گیری از این منابع می‌باشد و پیامد‌های ناشی از پیوندهای آلورژیک نظیر بیماری پیوند بر ضد میزبان (GVHD) از دلایل مهم ناموفق بودن پیوند و مرگ و میر ناشی از آن به‌شمار می‌رود.

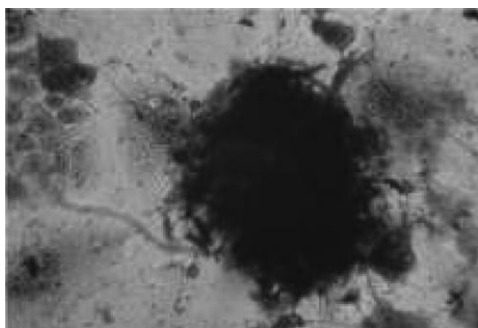
ایده‌آل‌ترین نوع پیوند دریافت عضو پیوندی از دو قلوبی همسان با ژنتیک یکسان (پیوند سینژنیک) و دریافت از خود فرد (اتولوگ) می‌باشند (۵).

پیوند سینژنیک بسیار نادر است ولی پیوند اتولوگ

و 20% Knockout serum Replacement (Invitrogen, USA) و Non essential amino acids و 1X mercaptoethanol  $10^{-4}M$  (Invitrogen, USA) و 1% penicillin (Sigma, USA) و human bFGF (Sigma, USA) و streptomycin (Millipore, USA) با غلظت ۴ تا ۱۰ نانوگرم در میلی لیتر به جای محیط معمولی افزوده شد. پس از حدود ۱۴ روز کلون‌های شبه جنینی ظاهر شدند، که با اضافه کردن کلاژناز (Sigma, IV, USA) و به صورت مکانیکی جدا و به پلیت ۲۴ خانه که بر روی آن‌ها سلول‌های فیبروبلاست جنینی موش غیرفعال شده با میتوماپسین C (۱۰ میکروگرم بر میلی لیتر) به عنوان لایه تغذیه کننده کشت داده شده بودند و در محیط جنینی انتقال داده شدند. برای اثبات و شناسایی کلون‌های شبه جنینی از رنگ‌آمیزی آلکالن فسفاتاز و بررسی ایمونوفلورسانس آنتی‌ژن‌های مختص جنینی Nanog, Oct4, TRA-1-SSEA-4, Stemgent (USA, 60(ES/iPS Characterization Kit) استفاده شد (شکل الف و ب).



شکل ۱) مراحل برنامه‌ریزی سلولی مجدد سلول‌های فیبروبلاست به سلول‌های شبه جنینی با استفاده از آدنو ویروس‌های حامل ژن‌های روایتی



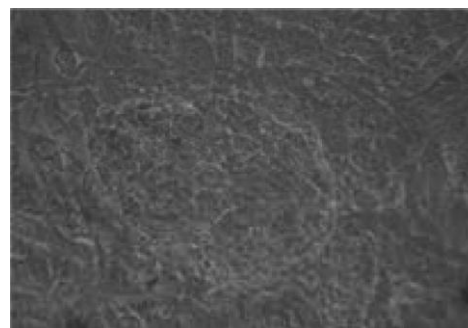
شکل ب) رنگ‌آمیزی آلکالن فسفاتاز مثبت از خصوصیات سلول‌های جنینی

نظربه صورت خارج کروموزومی، تأثیری بر ژنوم ندارد (۱۵ و ۱۶)؛ در نتیجه، سلول‌های هماتوپوئیتیک به دست آمده ایمن بوده و بدین ترتیب گام مهمی در به‌کارگیری بالینی آن‌ها برداشته می‌شود.

## مواد و روش‌ها

### تولید سلول‌های Adeno-iPS

به‌طور خلاصه از سلول‌های پوست ختنه‌گاه (Fore Skin) به‌عنوان سلول سوماتیک استفاده شد، که با همکاری پزشک و اطلاع والدین در محیط کشت حاوی آنتی‌بیوتیک به آزمایشگاه انتقال و به‌وسیله تیمار با تریپسین (Invitrogen, USA) و دیسپاز (Invitrogen, USA) سلول‌های اپیدرم جدا و تک سلول شده و در محیط کشت DMEM (Invitrogen, USA) و 10 FBS درصد (Gibco, Germany) کشت و تکثیر داده شدند (۱۷). پس از تولید و تکثیر آدنو ویروس‌های نوترکیب در سلول‌های A293، محیط حاوی ویروس جمع‌آوری و بر روی پلیت‌های شش‌خانه که در هر چاهک ۲۵۰۰۰۰ سلول فیبروبلاستی کشت داده شده بودند و محیط‌رویی از پیش برداشته شده بود، افزوده شدند. پس از ۲۴ ساعت محیط رویی برداشته شده و محیط DMEM+10%FBS اضافه شده و در انکوباتور  $CO_2$  قرار داده شدند. این کار در روزهای سوم و پنجم تکرار شده و در روز هشتم محیط جنینی DMEM-F12 (Invitrogen, USA)



شکل الف) تصویر کلون سلولی iPS با ظاهر سلول‌های جنینی

GAPDH به‌عنوان کنترل استفاده شد و نتایج Real Time با استفاده از فرمول  $2^{-\Delta\Delta CT}$  بررسی شدند. نمونه سلول‌های EB موجود در محیط جنینی بدون bFGF به‌عنوان کالیبراتور استفاده شد.

#### فلوسایتومتری

برای بررسی فلوسایتومتری سلول‌های تمایز یافته از آنتی‌بادی‌های منوکلونال بر ضد سه شاخص آنتی‌ژنی استفاده شد. CD34 که یکی از شاخص‌های آنتی‌ژنی اصلی رده هماتوپوئیک است، CD38 که در سلول‌های هماتوپوئیک تعهد یافته بیشترین بیان را دارد و CD133 که سلول‌های بنیادی تمایز یافته که پیش‌ساز سلول‌های بنیادی هماتوپوئیک و اندوتلیال هستند آن را بیان می‌کنند.

سلول‌های اجسام شبه جنینی تمایز یافته به‌وسیله افزودن کلاژناز IV و به‌صورت مکانیکی از یکدیگر جدا شد و پس از فیکس شدن در پارافرمالدئید ۱ درصد، با آنتی‌بادی‌های منوکلونال اختصاصی کونژوگه CD34 (FITC - Conjugate)، CD38 (PE - Conjugate) رنگ‌آمیزی و بعد از نیم ساعت انکوباسیون در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد، در دستگاه فلوسایتومتری (PARTEC Co) آنالیز شدند.

نمودارها با نرم‌افزار Flomax تهیه و تجزیه و تحلیل شدند. بر این اساس با توجه به سه شرایط تمایزی برای هر یک کنترل منفی (آنتی‌بادی Isotype) جداگانه در نظر گرفته شده و با مرزبندی حداقل حدود ۹۷ درصد، نمودارهای Quadrant تعیین شدند.

#### تجزیه و تحلیل آماری

آزمایش‌ها به‌صورت سه بار تکرار انجام شدند و یافته‌ها پس از ثبت در نرم‌افزار SPSS (SPSS Inc)،

#### تولید اجسام شبه رویانی و تمایز به رده هماتوپوئیک

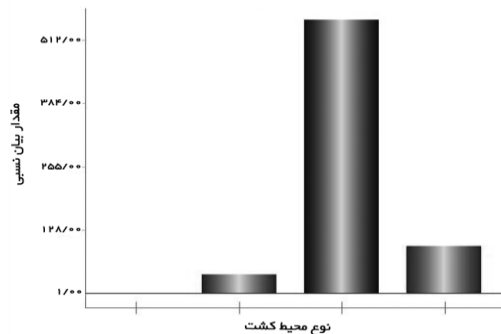
سلول‌های تمایز نیافته شبه جنینی پس از تکثیر بر روی سلول‌های لایه تغذیه کننده موشی با بهره از کلاژناز IV و به‌صورت مکانیکی برداشته شده و بعد از شمارش تعداد یک میلیون سلول شبه جنینی در پلیت‌های کشت با چسبندگی کم (USA)، (Low Attachment.Nunc)، و محیط کشت جنینی بدون bFGF به‌صورت Duplicate انتقال و کشت داده شدند. پس از ۳ روز اجسام شبه رویانی (Embryoid bodies) به‌صورت مکانیکی برداشته شده و در پلیت‌های ۲۴ خانه که قبلاً بر روی آن‌ها سلول‌های استرومای مغز استخوان موش غیرفعال شده با میتومايسين C کشت داده شده بودند، و در محیط تمایزی حاوی IMDM (USA, Invitrogen) و FBS ۵ تا ۱۲ درصد (Germany, Gibco) و 4mM Monothioglycerol (USA, sigma) کشت داده شدند و هر دو روز محیط تعویض شد.

#### RT-PCR

پس از گذشت ۱۴ روز سلول‌ها برداشته شده و پس از شستشو با PBS با کیت استخراج RNA (USA)، (Qiagen, Qiazole) تخلیص و یک میکروگرم از RNA با استفاده از آنزیم ترانس کریپتاز معکوس Random Primer و 10 mM dNTP، سنتز شد (Revert, Aid, Ukraine Fermentas). Real-Time PCR با استفاده از پرایمر اختصاصی ژن CD34 با دستگاه

(Applied BioSystem, USA) ABI 7000 میزان بیان ژن بررسی گردید. شرایط دمایی شامل ۳ دقیقه ۹۴، ۱۵ ثانیه ۹۴، ۱۵ ثانیه ۶۰ درجه و ۳۰ ثانیه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد بود. از پرایمر اختصاصی ژن

از استرومای مغز استخوان موش است؛ به گونه ای که بیش از ۵۵ درصد از سلولها CD34 مثبت بودند و حدود ۳۲ درصد از سلولها مارکر CD38 را بیان کردند (شکل ۳).



شکل ۳ نمودار بیان ژن CD34 پس از کشت سلولهای EB در محیط تمایزی

همانطور که در شکل ۴ دیده می شود تعداد سلولهای CD133 به عنوان پیش ساز سلولهای هماتوپوئیک و پشتیبان کننده هماتوپوئز در محیط تمایزی دارای استروما (۴۸/۸۸ درصد) و محیط تمایزی بدون استروما (۵۲/۱۶ درصد) به صورت معنی داری بالاتر است.

USA، IL، Chicago) ویرایش ۱۱ و با استفاده از آزمون ناپارامتری Man Whitney مقایسه شدند و ( $P < 0.05$ ) به عنوان معنی دار در نظر گرفته شد.

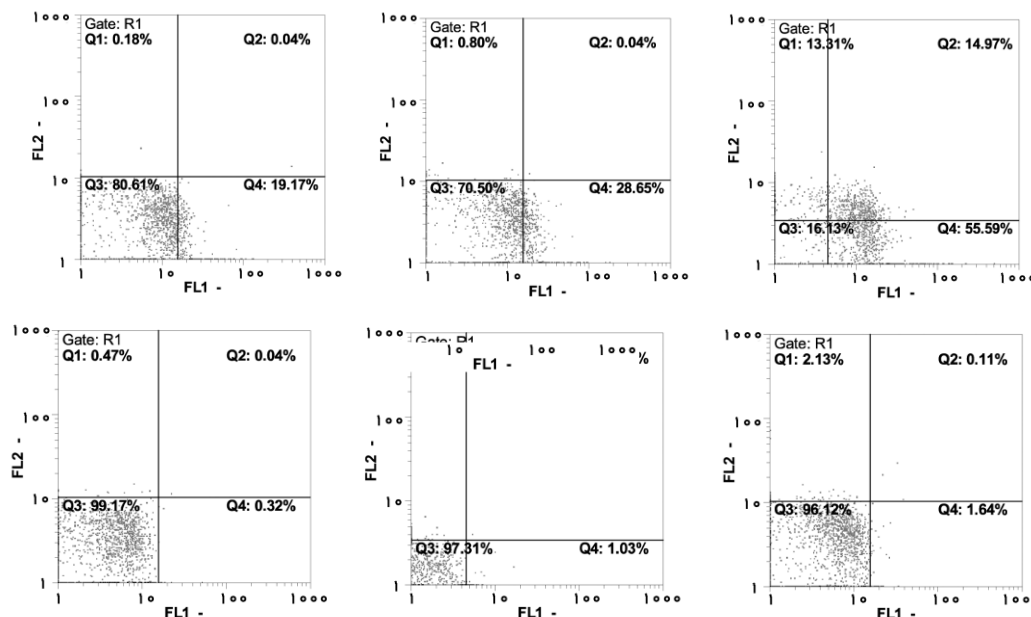
## یافته‌ها

### Real Time PCR

برای تعیین تمایز به رده هماتوپوئیک با استفاده از پرایمرهای اختصاصی CD34 و روش PCR کمی، میزان تغییر بیان ژن در مقایسه با EBهای موجود در محیط غیر تمایزی بررسی گردید. همان گونه که در شکل ۳ مشاهده می شود، بالاترین میزان بیان ژن CD34 که شاخص اصلی تمایز به رده هماتوپوئیک می باشد در سلولهای جنینی کشت داده شده در محیط تمایزی و بر روی سلولهای غیر فعال شده استرومای مغز استخوان دیده می شود، بنابراین استروما نقش زیادی در تمایز داشته است.

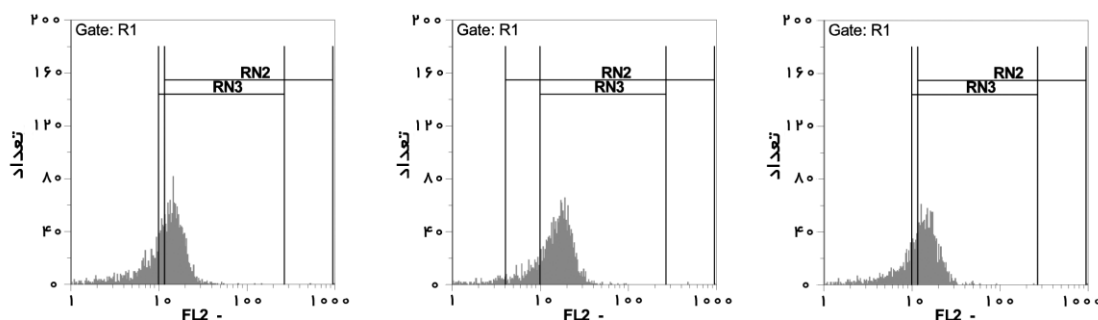
### فلوسایتومتری

در آنالیز فلوسایتومتری یافته ها نشان دهنده بیشترین میزان سلولهای CD34+ و CD38+ در محیط تمایزی متشکل



شکل ۴ نتایج فلوسایتومتری آنژیژن (FL2)CD38/(FL1)CD34

ردیف بالا به ترتیب از چپ به راست: بدون محیط تمایزی، بر روی استرومای مغز استخوان، بدون استروما؛ ردیف پایین کنترل منفی (ایزوتایپ آنژیژن)



شکل ۵) نتایج فلوسایتومتری آنتی ژن (FL1)CD133 نشان‌دهنده درصد بالای سلول‌های CD133 مثبت در محیط حاوی لایه از سلول‌های غیرفعال شده استرومای مغز استخوان موشی. به ترتیب از چپ به راست: بدون محیط تمایزی، بر روی استرومای مغز استخوان، بدون استروما

## بحث

القاشده یا iPS که همه ویژگی‌های جنینی را دارا بوده و قادر به تمایز به تمام رده‌های سلولی هستند، تولید و تکثیر سلول‌های بنیادی اتولوگ در آزمایشگاه و اصلاح ژنتیکی میسر شده است (۲۵). اخیراً با استفاده از تولید سلول‌های iPS از فیبروبلاست‌های موش مدل تالاسمی بتای انسانی و اصلاح ژن بتا با روش نوترکیبی همولوگ، به گونه‌ای موفقیت‌آمیز موش مبتلا درمان شده است (۲۶). در بررسی‌های دیگر مدل‌های موشی هموفیلی A و سلول‌های انسانی فرد مبتلا به کم‌خونی فانکونی درمان شده‌اند (۲۷ و ۲۸). امروزه یکی از مباحث مهم در تولید سلول‌های بنیادی هماتوپوئیک اتولوگ و ویژه بیمار از سلول‌های شبه جنینی، استفاده از سلول‌هایی است که با حداکثر ایمنی و کمترین خطر به دست آمده باشند. بنابراین در این بررسی از وکتورهای آدنوویروسی نسل دوم که بدون بخش‌های اساسی و لازم برای تکثیر ویروس می‌باشند و ضمن برخوردار بودن از بیان بالای ژن، در ژنوم سلول میزبان ادغام نشده و به صورت خارج کروموزومی تکثیر و بیان می‌گردند، استفاده شد که حامل ژن‌های مختص

از زمان معرفی تکنیک پیوند سلول‌های بنیادی هماتوپوئیک در سال ۱۹۵۷ هزاران عمل پیوند انجام شده و موجب درمان بسیاری از بیماران شده است (۱۸ و ۱۹). با این حال، محدودیت‌های زیادی در انجام این روش وجود دارد که عبارتند از: ۱) بسیاری از پیوندها به دلیل ناسازگاری آنتی‌ژن‌های بافتی ناموفق بوده‌اند و درصد کمی از آن‌ها به صورت اتولوگ انجام می‌شوند (۲۰-۲۲). منابع سلول‌های بنیادی هماتوپوئیک و شمار آن‌ها کم و تلاش‌های صورت گرفته برای تکثیر در محیط آزمایشگاه ناموفق بوده‌اند (۳ و ۲۲). امکان ژن درمانی و اصلاح ژنتیکی در سلول‌های هماتوپوئیک قبل از پیوند به دلیل محدودیت‌های تکنیکی هم اکنون بسیار دور از ذهن است (۲۳). تولید سلول‌های هماتوپوئیک از سلول‌های جنینی در آزمایشگاه و اصلاح ژنتیکی آن‌ها اگر چه در سال‌های اخیر موفقیت‌آمیز بوده ولی به دلیل محدودیت‌های تکنیکی، زیستی و اخلاقی قابل به‌کارگیری در امور بالینی نمی‌باشد (۲۴). با تولید سلول‌های شبه جنینی از سلول‌های سوماتیک

شده‌اند و نسبت به دو نوع محیط بدون استروما اختلاف معنی‌داری را نشان می‌دهد (۷۱ درصد CD34 مثبت و حدود ۲۸ درصد CD38 مثبت). همچنین در شکل ۴ نتایج میزان آنتی‌ژن CD133 دیده می‌شود که یک شاخص پیش تمایزی و نشان‌دهنده میزان سلول‌های پشתיبان کننده هماتوپوئز می‌باشد.

همان‌گونه که ملاحظه می‌گردد سلول‌های CD133 مثبت تولید شده در محیط استرومایی نسبت به محیط غیرتمایزی و بدون استرومایی به صورت معنی‌داری بالاست. همان‌طور که مشاهده می‌شود اختلاف معنی‌داری بین نتایج حاصل از محیط غیرتمایزی و بدون استرومایی وجود ندارد. نتایج این بررسی ضمن معرفی سلول‌های شبه جنینی القا شده با وکتورهای آدنوویروس نشان می‌دهد سلول‌های به دست آمده با این روش قادر به تمایز و تولید سلول‌های هماتوپوئتیک بوده و در محیط حاوی سلول‌های غیرفعال شده استرومای مغز استخوان موش، بدون استفاده از فاکتورهای رشد به راحتی قابل تکثیر به صورت نامحدود می‌باشند.

تولید سلول‌های iPS از یک بیمار مشخص ما را قادر به تولید انواع سلول‌های مبتلا از فرد بیمار به تعداد زیاد می‌کند. این سلول‌های iPS ویژه بیمار را می‌توان برای مدل سازی بیمار، کشف دارو، و سلول درمانی مورد استفاده قرار داد. تولید سلول‌های iPS این امکان را فراهم می‌سازد تا سلول‌های مختص بیمار تولید شود که توسط سیستم ایمنی فرد به عنوان خودی شناخته شده و موضوع رد پیوند حل می‌شود. بنابراین، انواع سلول‌های اتولوگ حاصله را می‌توان پس از تصحیح ژنتیکی از سلول‌های iPS به دست آورده و به فرد بیمار پیوند زد. با وجود این، قبل از به کارگیری فن‌آوری تولید iPS در کارآزمای‌های بالینی لازم است

سلول‌های جنینی بودند. نخستین بار تولید سلول‌های iPS با بهره از آدنوویروس ۲۶ در سال ۲۰۰۸ در موش انجام و یک سال بعد در انسان انجام شد (۲۹). در هر دو بررسی، وکتورهای مورد استفاده حامل ژن‌های موشی بودند. اگر چه شمار کلون‌های شبه جنینی به دست آمده در مقایسه با وکتورهای لنتی و رتروویروسی کم هستند ولی به لحاظ ایمن بودن روش از اهمیت بسیاری برخوردار است. در این تحقیق هدف دیگر تمایز و تولید سلول‌های بنیادی هماتوپوئتیک از سلول‌های Adeno-iPS و با کمترین هزینه و ساده‌ترین تکنیک، بدون استفاده از فاکتورهای رشد بود.

همان‌گونه که از یافته‌های Real-Time PCR مشاهده می‌گردد، سلول‌های تمایز یافته بر روی استرومای موش در مقایسه با محیط تمایزی بدون استروما به صورت معنی‌دار و به میزان زیادی ژن CD34 را بیان کرده‌اند، که یکی از دلایل آن تشکیل محیط میکروسکوپی سه بعدی توسط سلول‌های استرومایی و پشתיبانی از سلول‌های در حال تمایز با ترشح فاکتورهای القا کننده مانند انواع اینترلوکین‌ها و هپاران سولفات می‌تواند باشد. این نتیجه با پژوهش‌های پیشین بر روی سلول‌های بنیادی جنینی و سلول‌های شبه جنینی مطابقت دارد (۱۱ و ۳۰). با مشاهده نتایج فلوسایتومتری در شکل‌های ۳ و ۴ نیز نتیجه PCR تأیید می‌گردد.

آنتی‌ژن CD34 مارکر اختصاصی سلول‌های تمایز یافته به رده هماتوپوئتیک است و آنتی‌ژن CD38 مختص سلول‌های هماتوپوئتیک متعهد شده می‌باشد که از شکل ۳ نتیجه‌گیری می‌شود. کسر زیادی از سلول‌های iPS در محیط استرومایی به رده هماتوپوئتیک تبدیل

بنیادی" در مرکز تحقیقات هماتولوژی، انکولوژی و پیوند مغز استخوان صورت گرفته است، بدین وسیله از همکاری و حمایت شبکه سلول‌های بنیادی سپاس و قدردانی می‌گردد.

ارزیابی‌های کیفی استاندارد شده جدیدی را برای سلول‌های iPS تدوین نمود تا وضعیت سلولی کامل سلول‌های باز برنامه‌ریزی شده آتی مشخص گردد.

### سپاس و قدردانی

پژوهش کنونی با حمایت مالی "شبکه سلول‌های

### References:

- Lengerke C, Daley GQ. Autologous blood cell therapies from pluripotent stem cells. *Blood Rev* 2010; 24: 27-37.
- Kyba M, Daley GQ. Hematopoiesis from embryonic stem cells: lessons from and for ontogeny. *Exp Hematol* 2003; 31: 994-1006.
- Orkin SH, Zon LI. Hematopoiesis: an evolving paradigm for stem cell biology. *Cell* 2008; 132: 631-44.
- Cheuk DK. Optimal stem cell source for allogeneic stem cell transplantation for hematological malignancies. *World J Transplant* 2013;3:99-112.
- Rice CM, Scolding NJ. Autologous bone marrow stem cells--properties and advantages. *J Neurol Sci* 2008;265:59-62.
- Thomas KR, Folger KR, Capecchi MR. High frequency targeting of genes to specific sites in the mammalian genome. *Cell* 1986; 44: 419-28.
- Zwaka TP, Thomson JA. Homologous recombination in human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* 2003; 21: 319-21.
- Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 2006; 126: 663-76.
- Okita K, Ichisaka T, Yamanaka S. Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature* 2007; 448: 313-7.
- Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse fibroblasts by four transcription factors. *Cell Prolif* 2008; 41: 51-6.
- Sakamoto H, Tsuji-Tamura K, Ogawa M. Hematopoiesis from pluripotent stem cell lines. *Int J Hematol* 2010; 91: 384-91.
- Feng Q, Lu SJ, Klimanskaya I, et al. Hemangioblastic derivatives from human induced pluripotent stem cells exhibit limited expansion and early senescence. *Stem Cells* 2010; 28: 704-12.
- Kazuki Y, Hiratsuka M, Takiguchi M, et al. Complete genetic correction of ips cells from Duchenne muscular dystrophy. *Mol Ther* 2010; 18: 386-93.
- Nienhuis AW, Dunbar CE, Sorrentino BP. Genotoxicity of retroviral integration in hematopoietic cells. *Mol Ther* 2006; 13: 1031-49.
- Huschtscha LI, Napier CE, Noble JR, et al. Enhanced isolation of fibroblasts from human skin explants. *BioTechniques* 2012;53:239-44.
- Chailertvanitkul VA, Pouton CW. Adenovirus: a blueprint for non-viral gene delivery. *Curr Opin Biotechnol* 2010; 21: 627-32.
- Leon RP, Hedlund T, Meech SJ, et al. Adenoviral-mediated gene transfer in lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95: 13159-64.
- Thomas ED, Lochte HL Jr, LU WC, et al. Intravenous infusion of bone marrow in patients receiving radiation and chemotherapy. *N Engl J Med* 1957; 257: 491-6.
- Pamphilon D, Siddiq S, Brunskill S, et al. Stemcell donation--what advice can be given to the donor?. *Br J Haematol* 2009; 147: 71-6.
- Baron F, Maris MB, Sandmaier BM, et al. Graft-versus-tumor effects after allogeneic hematopoietic cell transplantation with nonmyeloablative conditioning. *J Clin Oncol* 2005; 23: 1993-2003.
- Pulsipher MA, Chitphakdithai P, Miller JP, et al. Adverse events among 2408 unrelated donors of peripheral blood stem cells: results of a prospective trial from the National Marrow Donor Program. *Blood* 2009; 113: 3604-11.
- Wagemaker G. In vitro and in vivo expansion of stem cell populations. *Vox Sang* 1998; 74:



- 463-6.
23. Weatherall DJ. Scope and limitations of gene therapy. *Br Med Bull* 1995; 51: 1-11.
24. de Wert G, Mummery C. Human embryonic stem cells: research, ethics and policy. *Hum Reprod* 2003; 18: 672-82.
25. Narsinh KH, Wu JC. Gene correction in human embryonic and induced pluripotent stem cells: promises and challenges ahead. *Mol Ther* 2010; 18: 1061-3.
26. Hanna J, Wernig M, Markoulaki S, et al. Treatment of sickle cell anemia mouse model with iPS cells generated from autologous skin. *Science* 2007; 318: 1920-3.
27. Xu D, Alipio Z, Fink LM, et al. Phenotypic correction of murine hemophilia A using an iPS cell-based therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; 106: 808-13.
28. Raya A, Rodriguez-Piza I, Guenechea G, et al. Disease-corrected haematopoietic progenitors from Fanconi anaemia induced pluripotent stem cells. *Nature* 2009; 460: 53-9.
29. Stadtfeld M, Nagaya M, Utikal J, et al. Induced pluripotent stem cells generated without viral integration. *Science* 2008; 322: 945-9.
30. Ledran MH, Krassowska A, Armstrong L, et al. Efficient hematopoietic differentiation of human embryonic stem cells on stromal cells derived from hematopoietic niches. *Cell Stem Cell* 2008; 3: 85-98.

*Original Article*

## Generation of hematopoietic lineage cells from embryonic like cells

**Gh. Khamisipour<sup>1</sup>, AA. Pourfathollah<sup>2\*</sup>, M. Soleimani<sup>3</sup>,  
M. Fourouzandeh Moghaddam<sup>4</sup>, M. Norouzinia<sup>5</sup>, S. Kavyani<sup>3</sup>,  
K. Ali Moghaddam<sup>6</sup>, Gh. Heydari<sup>7</sup>, HR. Alizadeh-Otaghvar<sup>8</sup>**

<sup>1</sup> Department of laboratory sciences, School of Para medicine, Bushehr University of Medical Sciences, Bushehr, IRAN

<sup>2</sup> Department of Immunology, School of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, IRAN

<sup>3</sup> Department of Hematology, School of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, IRAN

<sup>4</sup> Department of Biotechnology, School of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, IRAN

<sup>5</sup> Department of Medical Genetic, School of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, IRAN

<sup>6</sup> Department of Oncology, School of Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, IRAN

<sup>7</sup> The Persian Gulf Tropical Medicine Research Center, The Persian Gulf Biomedical Research Center, Bushehr University of Medical Sciences, Bushehr, IRAN

<sup>8</sup> Department of Surgery, School of Medicine, Bushehr University of Medical Sciences, Bushehr, IRAN

(Received 8 Nov, 2011      Accepted 11 Apr, 2012)

### *Abstract*

**Background:** Epigenetic reprogramming of somatic cells into embryonic stem cells has attracted much attention, because of the potential for stem cell transplantation and compatibility with recipient. However, the therapeutic application of either nuclear transfer or nuclear fusion of somatic cell has been hindered by technical complications as well as ethical objections. Recently, a new method is reported whereby ectopic expression of embryonic specific transcription factors was shown to induce fibroblasts to become embryonic like SCs (induced pluripotent stem cells). A major limitation of this method is the use of potentially harmful genome integrating viruses such as retro- or lentivirus. The main aim of this investigation was generation of human hematopoietic stem cells from induced fibroblasts by safe adenovectors carrying embryonically active genes.

**Material and Methods:** Isolated fibroblasts from foreskin were expanded and recombinant adenoviruses carrying human Sox2, Oct4, Klf4, cMyc genes were added to culture. After formation of embryonic like colonies and cell expansion, they were transferred to embryonic media without bFGF, and embryoid bodies were cultured on stromal and non-stromal differentiation media for 14 days.

**Results:** Expression of CD34 gene and antigenic markers, CD34, CD38 & CD133 in stromal culture showed significant difference with non-differentiation and non-stromal media.

**Conclusion:** These findings show high hematopoietic differentiation rate of Adeno-iPS cells in stromal culture and no need to use growth factors. While, there was no difference between non-differentiation and non-stromal media.

**Key words:** adenovirus, iPS, differentiation, hematopoietic

\*Address for correspondence: Department of Immunology, School of Medicine, Tarbiat Modares University, Tehran, IRAN; E-mail: [pourfa@modares.ac.ir](mailto:pourfa@modares.ac.ir)

Website: <http://bpums.ac.ir>  
Journal Address: <http://ismj.bpums.ac.ir>