دوماهنامه طبّ جنوب
پژوهشکده زیست-پزشکی خلیج فارس
دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی بوشهر
سال هفدهم، شماره ۴، صفحه ۵۱۵ – ۵۰۶ (مهر و آبان ۱۳۹۳)
ISMJ 2014; 17(4): 506-515

تولید سلول‌های رده هماتوپوئتیک انسانی از سلول‌های شبه جنینی

غلامرضا خمیسی‌پور [۱]، علی‌اکبر پورفتح‌اله [۲*]، مسعود سلیمانی [۳]، مهدی فروزنده‌مقدم [۴]، مهرداد نوروزی‌نیا [۵]، سعید کاویانی [۳]، کامران علی‌مقدم [۶]، غلامرضا حیدری [۷]، حمیدرضا علیزاده اطاقور [۸]

[۱] گروه علوم آزمایشگاهی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی بوشهر
[۲] گروه ایمنی‌شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس
[۳] گروه خون‌شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس
[۴] گروه بیوتکنولوژی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس
[۵] گروه ژنتیک پزشکی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس
[۶] گروه خون و انکولوژی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران
[۷] مرکز تحقیقات طب گرمسیری و عفونی خلیج‌فارس، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی بوشهر
[۸] گروه جراحی، دانشکده 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 به‌دلیل اهمیت آن در پیوند سلول‌های بنیادی و سازگاری با گیرنده ازارزش بسیاری برخوردار است. با این‌حال، به‌کارگیری درمانی سلول‌های به‌دست آمده به‌دلیل مشکلات فنی و موضوعات اخلاقی امکان‌پذیر نیست. اخیرا 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 رتروویروس یالنتی ویروس می‌باشد. هدف اصلی این بررسی تولید سلول‌های بنیادی هماتوپوئتیک 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 **cMyc**، **Klf4**، **Oct4**، **Sox2** 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 به‌مدت 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 استروماداشتند.

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

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

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

E-mail: pourfa@modares.ac.ir

مقدمه

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 (hESCs) 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 هماتوپوئتیک با HLA سازگاراست و پیوند سلول‌های هماتوپوئتیک رایج‌ترین درمان متکی بر سلول است (۴).

هم اکنون سلول‌های بنیادی سوماتیک حاصل از مغز استخوان، بندناف و اخیرا خون محیطی تنها منابع سلول‌های قابل پیوند موجود جهت بازیابی بالینی توان هماتوپوئتیک 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 بهره گیری از این منابع می‌باشد و پیامد های ناشی از پیوندهای آلوژنیک نظیر بیماری پیوند بر ضد میزبان (GVHD) از دلایل مهم ناموفق بودن پیوند و مرگ ومیر ناشی از آن به‌شمار می‌رود.

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

پیوند سینژنیک بسیار نادر است ولی پیوند اتولوگ قابل انجام با وفور بالاست؛ با این‌حال، در بیماری‌های بدخیم خونی دارای محدودیت فنی برای پاکسازی سلول‌های بدخیم است و از سویی دیگر امکان تصحیح ژنتیکی در سلول‌های هماتوپوئتیک 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).

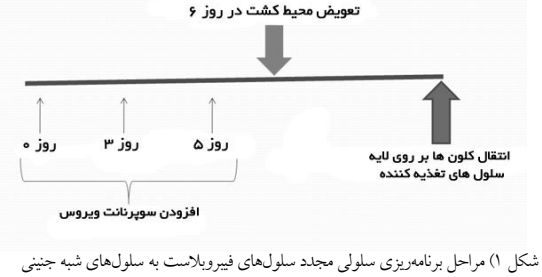
در سال‌های اخیر، دانشمندان با استفاده از وکتورهای ویروسی حامل ژن‌های دوره رویانی شامل ژن‌های Klf4، Oct4، Sox2 و cMyc و در سلول‌های سوماتیک توانستند سلول‌هایی با رفتار مشابه جنینی تولید کنند که به سلول‌های هر سه لایه جنینی قابل تمایز بوده و به‌همین دلیل سلول‌های پرتوان القایی یا سلول های iPS (Induced Pluripotent Stem Cells) نامیده شدند (۱۰-۸). با تولید این سلول‌ها، امکان تکثیر نامحدود، اصلاح ژنتیکی، و تمایز و تولید انواع سلول‌ها از جمله سلول‌های رده هماتوپوئتیک مختص بیمار میسر شد (۱۳-۱۱). 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. هم چنین بیان ژن مورد

نظربه صورت خارج کروموزومی،تأثیری برژنوم ندارد (۱۵ و ۱۶)؛ در نتیجه، سلول‌های هماتوپوئتیک به‌دست آمده ایمن بوده و بدین‌ترتیب گام مهمی در به‌کارگیری بالینی آن‌ها برداشته می‌شود.

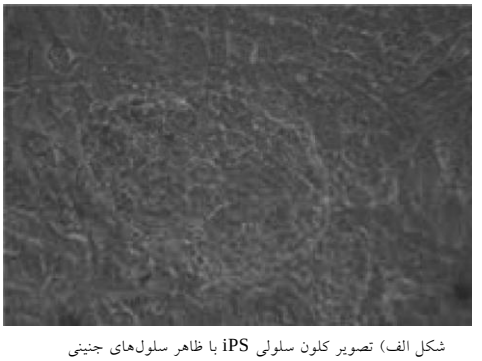
مواد و روش‌ها

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 A۲۹۳، 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 CO2 قرار داده شدند. این کار در روزهای سوم و پنجم تکرار شده و در روز هشتم محیط جنینی DMEM-F12 (Invitrogen ،USA) و Knockout serum Replacement20% (Invitrogen،USA) و Non essential amino acids (Invitrogen ،USA) 1X و mercaptoethanol 10^{-4}M (Sigma،USA) و penicillin-٪۱ streptomycin (Sigma،USA) و human bFGF (Millipore،USA) با غلظت ۴ تا ۱۰ نانوگرم در میلی‌لیتر به‌جای محیط معمولی افزوده شد. پس از حدود ۱۴ روز کلون‌های شبه جنینی ظاهر شدند، که با اضافه کردن کلاژناز (Sigma ،IV ،USA) و به‌صورت مکانیکی جدا و به پلیت ۲۴ خانه که بر روی آن‌ها سلول‌های فیبروبلاست جنینی موش غیرفعال شده با میتومایسین C (۱۰میکوگرم بر میلی‌لیتر) به‌عنوان 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 وبررسی ایمنوفلورسانس آنتی‌ژن‌های مختص جنینی Nanog، Oct4، SSEA-4-،TRA-1 60(ES/iPS Characterization، USA ،Stemgent، Kit) استفاده شد (شکل الف و ب).



شکل ۱) مراحل برنامه‌ریزی سلولی مجدد سلول‌های فیبروبلاست به سلول‌های شبه جنینی با استفاده ازآدنو ویروس‌های حامل ژن‌های رویاتی



شکل الف) تصویر کلون سلولی iPS با ظاهر سلول‌های جنینی



شکل ب) رنگ‌آمیزی آلکالن فسفاتاز مثبت از خصوصیات سلول‌های جنینی

تولید اجسام شبه رویانی و تمایز به رده هماتوپوئتیک

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 وکشت داده شدند. پس از ۳ روز اجسام شبه رویانی (Embryoid bodies) به‌صورت مکانیکی برداشته شده و در پلیت‌های ۲۴ خانه که قبلا بر روی آن‌ها سلول‌های استرومای مغز استخوان موش غیرفعال شده با میتومایسین C کشت داده شده بودند، و در محیط تمایزی حاوی IMDM (Invitrogen ،USA) و FBS ۵ تا ۱۲ درصد (Gibco ،Germany) و 4mM Monothioglycerol (sigma ،USA) 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، Qiazole، Qiagen) تخلیص و یک میکروگرم از RNA با استفاده از آنزیم ترانس کریپتاز معکوس Random Primer، و 10 mM dNTP،cDNA سنتز شد (UkrineFermentas، Aid، Revert). Real-Time PCR با استفاده از پرایمر اختصاصی ژن CD34 با دستگاه

ABI 7000 (Applied BioSystem ،USA) 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 GAPDH به‌عنوان کنترل استفاده شد و نتایج Real Time با استفاده از فرمول ۲-ΔΔCT بررسی شدند. نمونه سلول‌های EB موجود در محیط جنینی بدونbFGF به‌عنوان کالیبراتور استفاده شد.

فلوسایتومتری

برای بررسی فلوسایتومتری سلول‌های تمایزیافته از آنتی‌بادی‌های منوکلونال برضد سه شاخص آنتی‌ژنی استفاده شد. CD34 که یکی از شاخص‌های آنتی‌ژنی اصلی رده هماتوپوئتیک است، CD38 که در سلول‌های هماتوپوئتیک تعهد یافته بیشترین بیان را دارد و CD133 که سلول‌های بنیادی تمایزنیافته که پیش‌ساز سلول‌های بنیادی هماتوپوئتیک 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)، CD133 (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 بارتکرار انجام شدند و یافته‌ها پس از ثبت در نرم‌افزار SPSS (SPSS Inc،

Chicago، Il، USA) ویرایش ۱۱ و با استفاده از آزمون ناپارامتری Man Whitney مقایسه شدند و (P<۰/۰۵) به‌عنوان معنی‌دار در نظر گرفته شد.

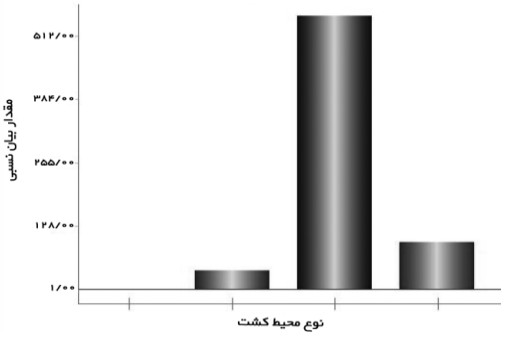
یافته‌ها

Real Time PCR

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

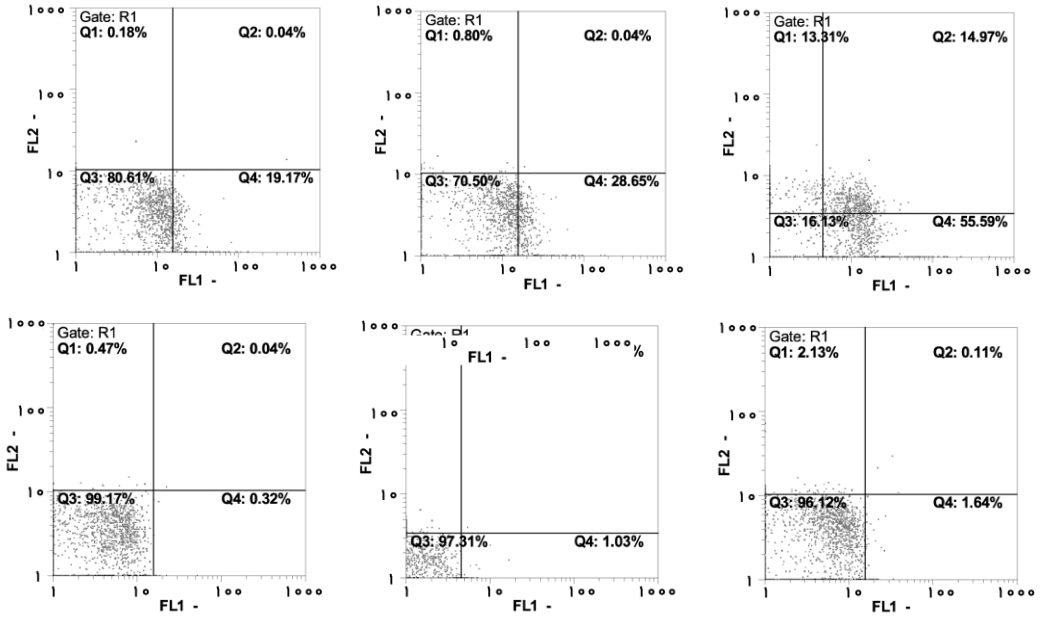
فلوسایتومتری

در آنالیز فلوسایتومتری یافته ها نشان‌دهنده بیشترین میزان سلول‌های CD34+ و CD38+ در محیط تمایزی متشکل از استرومای مغز استخوان موش است؛ به‌گونه ای که بیش از ۵۵ درصد از سلول‌ها CD34 مثبت بودند و حدود ۳۲ درصد از سلول‌ها مارکر CD38 را بیان کردند (شکل ۳).



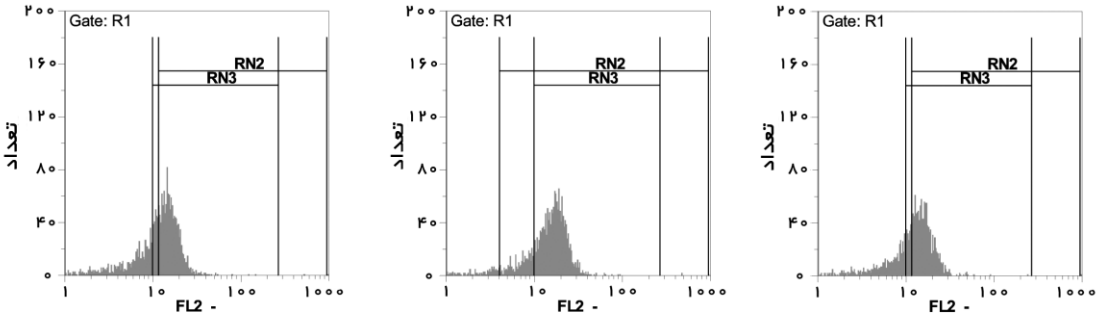
شکل ۳) نمودار بیان ژن CD34 پس از کشت سلول‌های EB در محیط تمایزی

همان‌طور که در شکل ۴ دیده می‌شود تعداد سلول‌های CD133 به‌عنوان پیش‌ساز سلول‌های هماتوپوئتیک و پشتیبان کننده هماتوپوئز در محیط تمایزی دارای استروما (۸۲/۹۶ درصد) نسبت به محیط غیرتمایزی (۴۸/۸۸ درصد) و محیط تمایزی بدون استروما (۵۲/۱۶ درصد) به‌صورت معنی‌داری بالاتراست.



شکل۴) نتایج فلوسایتومتری آنتی‌ژن (FL2)CD38/(FL1)CD34

ردیف بالا به‌ترتیب از چپ به راست: بدون محیط تمایزی، بر روی استرومای مغزاستخوان، بدون استروما؛ ردیف پایین کنترل منفی (ایزوتایپ آنتی‌بادی)



شکل۵) نتایج فلوسایتومتری آنتی‌ژن (CD133(FL1، نشان‌دهنده درصد بالای سلول‌های CD133 مثبت در محیط حاوی لایه از سلول‌های غیرفعال شده استرومای مغز استخوان موشی. به‌ترتیب از چپ به راست: بدون محیط تمایزی، بر روی استرومای مغز استخوان، بدون استروما

بحث

از زمان معرفی تکنیک پیوند سلول‌های بنیادی هماتوپوئتیک در سال ۱۹۵۷ هزاران عمل پیوند انجام شده و موجب درمان بسیاری از بیماران شده است (۱۸ و ۱۹). با این‌حال، محدودیت‌های زیادی در انجام این روش وجود دارد که عبارتند از: ۱) بسیاری از پیوندها به‌دلیل ناسازگاری آنتی‌ژن‌های بافتی ناموفق بوده‌اند و درصد کمی از آن‌ها به‌صورت اتولوگ انجام می‌شوند (۲۲-۲۰).

منابع سلول‌های بنیادی هماتوپوئتیک 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 هماتوپوئتیک قبل از پیوند به‌دلیل محدودیت‌های تکنیکی هم اکنون بسیار دور از ذهن است (۲۳). تولید سلول‌های هماتوپوئتیک از سلول‌های جنینی در آزمایشگاه و اصلاح ژنتیکی آن‌ها اگر چه در سال‌های اخیر موفقیت‌آمیز بوده ولی به‌دلیل محدودیت‌های تکنیکی، زیستی و اخلاقی قابل به‌کارگیری در امور بالینی نمی‌باشد (۲۴). با تولید سلول‌های شبه جنینی از سلول‌های سوماتیک 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 هماتوپوئتیک اتولوگ و ویژه بیمار از سلول‌های شبه جنینی، استفاده از سلول‌هایی است که با حداکثر ایمنی و کمترین خطر به‌دست 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 به‌صورت خارج کروموزومی تکثیر و بیان می‌گردند، استفاده شد که حامل ژن‌های مختص

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 به‌دست 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 به‌صورت معنی‌دار و به‌میزان زیادی ژن CD34 را بیان کرده‌اند، که یکی از دلایل آن تشکیل محیط میکروسکوپی سه بعدی توسط سلول‌های استرومایی و پشتیبانی از سلول‌های در حال تمایز با ترشح فاکتورهای القا کننده مانند انواع اینترلوکین‌ها و هپاران سولفات می‌تواند باشد. این نتیجه با پژوهش های 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 آنتی ژن 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 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 پشتیبان کننده هماتوپوئز می‌باشد.

همان‌گونه که ملاحظه می‌گردد سلول‌های CD133 مثبت تولید شده در محیط استرومایی نسبت به محیط غیرتمایزی و بدون استرومایی به‌صورت 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 به‌دست 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 به‌راحتی قابل تکثیر به‌صورت 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 به‌عنوان خودی شناخته شده و موضوع رد پیوند حل می‌شود. بنابراین، انواع سلول‌های اتولوگ حاصله را می‌توان پس از تصحیح ژنتیکی از سلول‌های iPS به‌دست آورده و به فرد بیمار پیوند زد. با وجود این، قبل از به‌کارگیری فن‌آوری تولید iPS در کارآزمای‌های بالینی لازم است

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

References:

1.Lengerke C, Daley GQ. Autologous blood cell therapies from pluripotent stem cells. Blood Rev 2010; 24: 27-37.

2.Kyba M, Daley GQ. Hematopoiesis from embryonic stem cells: lessons from and for ontogeny. Exp Hematol 2003; 31: 994-1006.

3.Orkin SH, Zon LI. Hematopoiesis: an evolving paradigm for stem cell biology. Cell 2008; 132: 631-44.

4.Cheuk DK. Optimal stem cell source for allogeneic stem cell transplantation for hematological malignancies. World J Transplant 2013;3:99-112.

5.Rice CM, Scolding NJ. Autologous bone marrow stem cells--properties and advantages. J Neurol Sci 2008;265:59-62.

6.Thomas KR, Folger KR, Capecchi MR. High frequency targeting of genes to specific sites in the mammalian genome. Cell 1986; 44: 419-28.

7.Zwaka TP, Thomson JA. Homologous recombination in human embryonic stem cells. Nat Biotechnol 2003; 21: 319-21.

8.Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. Cell 2006; 126: 663-76.

9.Okita K, Ichisaka T, Yamanaka S. Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. Nature 2007; 448: 313-7.

10.Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse fibroblasts by four transcription factors. Cell Prolif 2008; 41: 51-6.

11.Sakamoto H, Tsuji-Tamura K, Ogawa M. Hematopoiesis from pluripotent stem cell lines. Int J Hematol 2010; 91: 384-91.

12.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.

13.Kazuki Y, Hiratsuka M, Takiguchi M, et al. Complete genetic correction of ips cells from Duchenne muscular dystrophy. Mol Ther 2010; 18: 386-93.

14.Nienhuis AW, Dunbar CE, Sorrentino BP. Genotoxicity of retroviral integration in hematopoietic cells. Mol Ther 2006; 13: 1031-49.

15.Huschtscha LI, Napier CE, Noble JR, et al. Enhanced isolation of fibroblasts from human skin explants. BioTechniques 2012;53:239-44.

16.Chailertvanitkul VA, Pouton CW. Adenovirus: a blueprint for non-viral gene delivery. Curr Opin Biotechnol 2010; 21: 627-32.

17.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.

18.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.

19.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.

20.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.

21.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.

22.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 generatedwithout 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.

ISMJ 2014; 17(4): 506-515

Original Article

Generation of hematopoietic lineage cells from embryonic like cells

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

[1] Department of laboratory sciences, School of Para medicine, Bushehr University of Medical Sciences, Bushehr, IRAN
[2] Department of Immunology, School of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, IRAN
[3] Department of Hematology, School of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, IRAN
[4] Department of Biotechnology, School of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, IRAN
[5] Department of Medical Genetic, School of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, IRAN
[6] Department of Oncology, School of Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, IRAN
[7] The Persian Gulf Tropical Medicine Research Center, The Persian Gulf Biomedical Research Center, Bushehr University of Medical Sceinecs, Bushehr, IRAN
[8] 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 reto- 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 Imonology, School of Medicine, Tarbiat Modares University, Tehran, IRAN; E-mail: pourfa@modares.ac.ir