

تمایز سلول های پرتوان القا شده انسانی به دودمان های سلولی استخوانی و چربی

الهام حویزی^۱، طیبه محمدی^۱

^۱ استادیار، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید چمران اهواز

چکیده

سابقه و هدف: سلول های پرتوان القا شده انسانی (hiPS) به عنوان یکی از منابع جدید، به منظور تولید سلول های تمایز یافته برای سلول درمانی مورد توجه هستند. سلول های hiPS می توانند در زمینه تحقیقات چندانگانه و ابزارهای بالینی برای درک مدل های حیوانی، تکوین و غربالگری داروهای کاندید و سلول درمانی در حمایت از طب ترمیمی مورد استفاده قرار گیرند. در اینجا ما توان تمایز سلول های hiPS به سلول های استئوبلاست و آدیپوسیت را مورد بررسی قرار دادیم.

روش بررسی: سلول های hiPS کشت و طی چندین پاساژ تکثیر شدند. سپس سلول ها به مدت ۲۱ روز در محیط مناسب برای تمایز به سلول های استخوانی و چربی کشت شدند. در پایان، تمایز سلولی با رنگ آمیزی اختصاصی و qRT-PCR بررسی شد.

یافته ها: سلول های hiPS در محیط تمایزی استخوان، توده های استخوانی تشکیل دادند که با آلیزارین قرمز، قرمز رنگ شدند. در محیط تمایزی چربی، در سیتوپلاسم سلول ها قطرات چربی تجمع یافت که با رنگ آمیزی Oil red قرمز شدند. بر اساس نتایج qPCR- RT ژن های مختص سلول های استخوانی شامل استئوکلسین و استئوپونتین، و ژن های مختص سلول های چربی شامل LPL و PPAR به ترتیب در سلول های استخوانی و چربی بیان شدند.

نتیجه گیری: در مجموع می توان گفت که سلول های hiPS از نظر پتانسیل تمایزی، سلول های پرتوانی هستند و قادرند به رده های استخوانی و چربی تمایز یابند.

واژگان کلیدی: تمایز، سلول های پرتوان القا شده، سلول های استخوانی و چربی.

مقدمه

سلول های بنیادی، سلول های اولیه ای هستند که توانایی تبدیل و تمایز به انواع مختلف سلول های انسانی را دارند و از آنها می توان در تولید سلول ها و در نهایت بافت های مختلف در بدن انسان استفاده کرد. امروزه استفاده از این سلول ها جهت ترمیم بافت های آسیب دیده انسانی در حال گسترش است. سلول های بنیادی سلول های پرتوانه یا چند توانه ای هستند و قابلیت تبدیل به بافت های مختلف، نظیر بافت عصبی، عضلانی، پوششی و غیره را دارند که این توانایی محور اصلی توجه به سلول های بنیادی است (۳، ۴). سلول بنیادی برای دوره های نامحدودی، قابلیت تقسیم خود به خودی دارد و در شرایط مناسب و یا در هنگام وجود سیگنال های مطلوب قادر به تولید انواع سلول ها است (۵). امروزه از منابع مختلفی برای به دست آوردن سلول های بنیادی استفاده می شود و یکی از جدیدترین انواع سلول های بنیادی که در مطالعات اخیر

زیست شناسان از دیر باز مراحل مختلف تکوینی جنینی را در انواع موجودات از پست ترین موجود تا انسان مورد توجه قرار داده اند تا به جواب این پرسش دست یابند که چگونه یک موجود پیچیده از تنها یک سلول، به وجود می آید. در دهه های گذشته علم پزشکی به سرعت متحول شده، تا آنجا که تحولات دیگر را تحت الشعاع قرار داده است. در دنیای علمی جدید پیوند انواع بافت ها، روش های نوین سلول درمانی و اصلاح نژادی حیوانات گسترش یافته و دانشمندان برای تولید انواع بافت ها و اعضای انسانی گام های موثری برداشته اند (۱، ۲).

آدرس نویسنده مسئول: اهواز، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید چمران اهواز، الهام

حویزی (email: e.hoveizi@scu.ac.ir)

تاریخ دریافت مقاله: ۹۴/۵/۱۹

تاریخ پذیرش مقاله: ۹۴/۱۰/۶

سلول‌های iPS به موش‌های nude دیده شد که توده سرطانی نیز ایجاد شد. این آزمایش‌های reprogramming منجر به تولید یک منبع سلولی جدید شد، بدون اینکه هیچ مسئله اخلاقی و محدودیتی در منبع سلولی وجود داشته باشد. سلول‌های سوماتیک و سلول‌های بنیادی پرتوان از نظر مورفولوژی، بیان ژن‌ها و فعالیت‌های عملکردی متفاوت هستند، بنابراین شگفت‌انگیز است که فقط چهار یا حتی بیان سه ژن منجر به این تغییر ساختار بسیار عظیم می‌شود. واضح است که همه این فاکتورهای رونویسی نقش‌های اختصاصی مهمی را در reprogramming سرنوشت سلول‌های تمایز یافته بازی می‌کنند (۸).

توانایی تمایز به انواع مختلف سلولی، خصوصیتی است که سلول‌های پرتوان القاء شده انسانی را به عنوان یک منبع تجدید شدنی برای درمان بیماری‌ها و نیز تست‌های آزمایشگاهی در مقیاس صنعتی معرفی می‌کند. تاکنون تلاش زیادی برای استفاده از این سلول‌ها در درمان بیماری‌های مختلف دستگاه اعصاب، بیماری‌های کبدی، دیابت، بیماری‌های قلبی و بیماری‌های دستگاه ماهیچه‌ای و اسکلتی انجام شده است (۱۱). اگر چه در سال‌های اخیر، پیشرفت‌های زیادی در زمینه استفاده از سلول‌های بنیادی در طب ترمیمی (regenerative medicine) حاصل شده است، اما موانع مهمی نیز در این زمینه وجود دارد (۱۲، ۱۳). در این مطالعه، ما نمونه‌ای از سلول‌های پرتوان القاء شده انسانی را کشت و تکثیر داده و توانایی تمایز آنها به سلول‌های استخوانی و سلول‌های چربی را مورد بررسی قرار دادیم.

مواد و روشها

کشت سلول‌های فیبروبلاست جنینی (MEF)

فیبروبلاست‌های جنینی موشی (MEF Mouse Embryonic Fibroblast) به عنوان بستری مناسب برای کشت سلول‌های پرتوان القاء شده مورد استفاده قرار می‌گیرند. سلول‌های MEF فاکتورهای مورد نیاز برای رشد و حفظ پرتوانی سلول‌های پرتوان القاء شده را ترشح می‌کنند. لایه تغذیه کننده جمعیتی از سلول‌های MEF است که به واسطه مایتومایسین C غیرفعال شده‌اند. در زمان مورد نیاز، فلاسک‌های حاوی MEF با تراکم حدود ۸۰-۷۰٪ به مدت ۲ ساعت با غلظت ۱۰ میکروگرم بر میلی لیتر مایتومایسین تیمار شده و سپس با PBS شستشو و آماده شدند.

مورد بررسی قرار گرفته‌اند، سلول‌های پرتوان القاء شده انسانی (hiPS) هستند. سلول‌های پرتوان القاء شده انسانی که در گروه سلول‌های جنینی قرار می‌گیرند، بر اساس توان تمایزی خود سلول‌هایی پرتوانی (pluripotent) هستند که به طور بالقوه قابلیت تمایز به غالب یا همه سلول‌های تشکیل دهنده بدن را دارا هستند (۶). استفاده از این سلول‌ها از این جهت مورد توجه است که با در دست داشتن سلول‌های بالغ فرد بیمار و با ایجاد تغییرات ژنتیکی در آنها می‌توان سلول بنیادی به دست آورد و با تمایز این سلول‌ها می‌توان برای سلول درمانی همان فرد استفاده شوند. از این رو برخی مشکلات ایمنی به دلیل عدم تطابق پروتئین‌های سطح سلولی، در پیوند این سلول‌ها وجود نخواهد داشت و امروزه منبع قابل توجهی از سلول‌های بنیادی محسوب می‌شود که می‌توانند امیدهای جدیدی در سلول درمانی ایجاد کنند (۹-۷).

به دلیل مشکلات کلونینگ، محققان تلاش‌های فراوانی انجام دادند تا ژن‌هایی که در مراحل اولیه جنینی بیان می‌شوند را فعال کنند و باعث افزایش بیان آنها شوند. با پیشرفت روش‌های ژن درمانی، محققین در ابتدا پیشنهاد دادند که ژن‌هایی را که در مراحل اولیه جنینی در بلاستومرها بیان می‌شوند و باعث خاصیت پرتوانی آنها می‌شوند، از طریق یک سری وکتورهای خاص به درون ژنوم یک سلول کاملاً تخصص یافته وارد کنند تا اینکه مشاهده شود که آیا این سلول‌ها می‌توانند به حالت پرتوانی برگردند. تحقیقات ادامه یافت تا اینکه در سال ۲۰۰۶، یامانکا و همکارانش بیان ژن‌های سلول‌های فیبروبلاستی و سلول‌های بنیادی جنینی موش را آنالیز و مقایسه کردند و ۲۴ کاندید از ژن‌ها را برای انتقال از طریق وکتور معرفی کردند. یامانکا و همکارانش توانستند با موفقیت، این ۲۴ فاکتور را از طریق رتروویروس‌ها وارد سلول‌های فیبروبلاست موش کنند و بعد از گذشت دو هفته مشاهده کردند که این سلول‌ها به سلول‌های پرتوان تبدیل شدند که هم از نظر مورفولوژی و خصوصیات رشد، مشابه سلول‌های بنیادی جنینی (ESC) بوده و هم مارکرهای ویژه سلول‌های جنینی را بیان می‌کردند. محققین این سلول‌های تولید شده را سلول‌های بنیادی پرتوان القاء شده نامیدند. این گروه از محققان به وسیله کاهش این ژن‌ها در فرایند انتقال در نهایت دریافتند که چهار فاکتور رونویسی، شامل Oct4, Sox2, Klf4 و c-Myc، برای تبدیل سلول‌های فیبروبلاست به iPS ضروری هستند (۱۰). سپس محققان سلول‌های iPS تولید شده را به درون یک بلاستوسیست تزریق کردند و مشاهده کردند که این سلول‌ها در تکوین جنین همکاری می‌کنند. با تزریق زیر پوستی

اسکوربیک اسید با غلظت ۵۰ میکروگرم در میلی لیتر، دگزامتازون با غلظت 10^{-7} مولار، ایندومتاسین با غلظت ۵۰ میکروگرم در میلی لیتر و FBS با غلظت ۱۰ درصد بود. برای ارزیابی تمایز سلول های پرتوان القاء شده انسانی به سلول های چربی، از رنگ آمیزی اوایل رد (Oil Red) استفاده شد.

استخراج RNA و انجام RT-PCR

الگوی بیان mRNA ژن ها در این مطالعه با استفاده از qRT-PCR انجام شد. برای استخراج RNA، سلول ها با استفاده از QIAzol لیز شدند و برای سنتز cDNA از TaqMan Reverse Transcription Kit (ساخت شرکت کیاژن، ژاپن) استفاده شد. برای هر نمونه، ۴۰ نانوگرم از cDNA سنتز شده با ۱۰ میکرولیتر از Power SYBER Green master mix (ساخت شرکت کیاژن، ژاپن) و ۰/۵ میکرولیتر از هر پرایمر (جدول ۱) مخلوط شد. Ct هر نمونه با استفاده از نرم افزار StepOne محاسبه و نرمالیزاسیون با استفاده از ژن HPRT انجام گرفت و هر آزمایش سه بار تکرار شد.

بررسی های آماری

داده های کنترل و آزمایش به صورت میانگین و انحراف از خطای میانگین محاسبه شدند و برای بررسی معنی دار بودن اختلاف بین گروه ها از توسط آزمون ANOVA و پس آزمون Tukey و نرم افزار SPSS (Ver.12) استفاده شد و $P < 0/05$ معنی دار در نظر گرفته شد.

یافته ها

بررسی مورفولوژی سلول های hips

سلول های بنیادی hips، کلونی های نسبتاً پهن و متراکمی را ساختند که در محیط بدون کلسیم و منیزیم و در حضور تریپسین به سادگی از هم جدا می شدند. این سلول ها هسته درشت و سیتوپلاسم کمی داشتند و در هسته یک یا چند هستک مشخص دیده می شد. علاوه بر این، سرعت تکثیر سلول های بنیادی hips و زمان مضاعف شدن جمعیت آنها حدود ۳۶ - ۳۲ ساعت بود (شکل ۱).

تمایز سلول های hiPS به سلول های استخوانی

برای اندازه گیری خاصیت پرتوانی سلول های iPS تولید شده برای مشتقات مزودرمی، شامل استئوسیت ها و آدیپوسیت ها، سلول های iPS به وسیله مولکول های سیگنالینگ القا شدند. برای تمایز به سلول های استخوانی، EB های تشکیل شده به وسیله β -glycerophosphate، اسکوربیک اسید و دگزامتازون،

کشت سلول های hiPS

سلول های hiPS به صورت معمول بر روی سلول های فیبروبلاست موشی که به عنوان یک لایه سلولی تغذیه کننده (MEF) محسوب می شوند، در محیط DMEM/F12 (Gibco) حاوی ۱۰٪ Knock Out Serum Replacement (SR) (Gibco)، ۵٪ Fetal bovine serum (FBS) (Gibco)، ال-گلوتامین با غلظت ۲ میلی مولار (Gibco)، بتامرکاپتوتانول (Gibco) با غلظت ۱/۱ میلی مولار، اسیدهای آمینه های ضروری (Sigma) با غلظت ۱ میلی مولار، پنی سیلین (Gibco) ۱٪ و bFGF (Gibco) با غلظت ۱۰ ng/ml در فلاسک کشت داده شدند. محیط کشت سلولی به صورت روزانه تعویض و معمولاً بعد از ۸ روز با استفاده از کلاژناز نوع چهار (Sigma) با غلظت ۱ mg/ml پاساژ داده شدند.

تمایز سلول های پرتوان القاء شده انسانی به سلول های

استخوانی

برای افزایش تمایز، سلول های iPS برای مدت ۵ روز در محیط کشت DMEM/F12 ساپلمنت شده با FBS ۵٪ قرار داده شدند تا EB (Embryoid bodies) تشکیل شود. سپس ۷۰ تا ۱۰۰ EBs تشکیل شده از سلول های پرتوان القاء شده انسانی در ظروف کشت ۶ خانه ای محتوی DMEM/F12 با FBS ۱۰٪ کشت شدند و پس از ۲۴ ساعت، با محیط استئوژنیک تعویض شدند. برای نمونه کنترل (سلول های تمایز نیافته)، ظرف کشت سلول ها به مدت ۲۱ روز در همان محیط DMEM/F12 (۱۰٪ FBS) نگهداری شد و محیط هر ۳-۴ روز یک بار تا ۲۱ روز تعویض شد. محیط استئوژنیک شامل محیط DMEM/F12 ترکیب با FBS با غلظت ۱۰ درصد، بتا-گلیسرول فسفات با غلظت ۱۰ میلی مولار، دگزامتازون با غلظت ۸-۱۰ مولار و اسکوربیک ۳-فسفات با غلظت ۵۰ میکروگرم در میلی لیتر بود. برای ارزیابی تمایز استئوژنیک از رنگ آمیزی اختصاصی آلیزارین رد (Alizarin Red) استفاده شد.

تمایز سلول های پرتوان القاء شده انسانی به سلول های

چربی

به این منظور، ۷۰ تا ۱۰۰ EBs تشکیل شده از سلول های پرتوان القاء شده انسانی در ظروف کشت ۶ خانه ای محتوی DMEM/F12 با FBS ۱۰٪ کشت شدند و پس از ۲۴ ساعت، با محیط آدیپوژنیک به مدت ۳ هفته تیمار شدند. محیط هر ۳-۴ روز یک بار به مدت ۲۱ روز تعویض شد. محیط آدیپوژنیک شامل محیط DMEM/F12 به علاوه

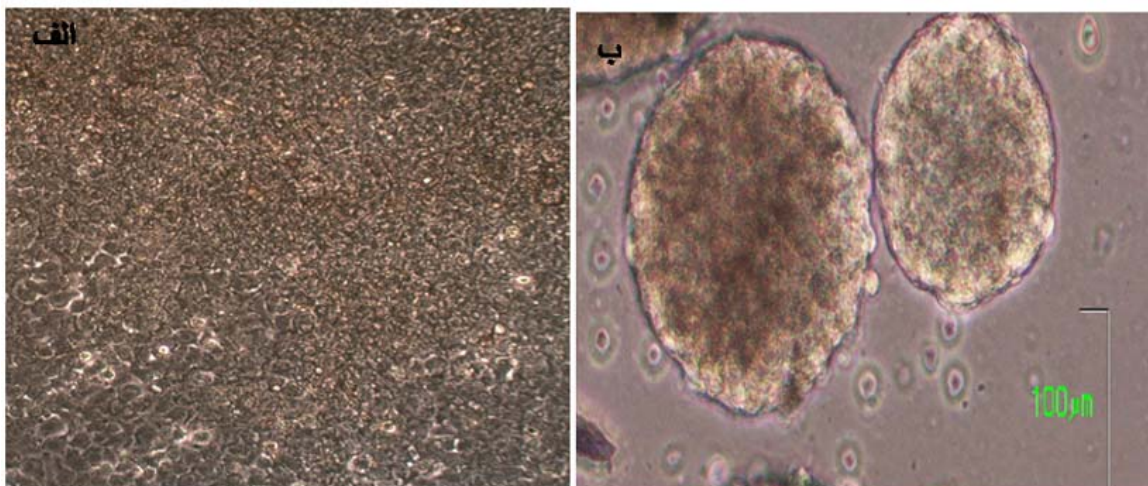
بودند، به وسیله Alizarin Red رنگ آمیزی شدند که نشان دهنده توانایی سلول‌های iPS تولید شده برای تمایز به سرنوشت استخوانی است (شکل ۲).

تمایز سلول‌های hiPS به سلول‌های چربی

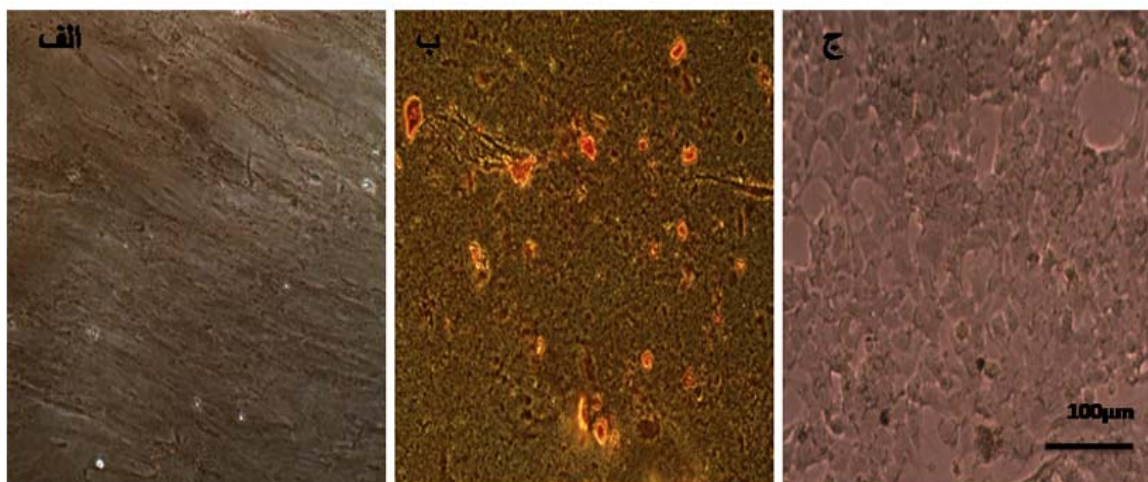
برای اثبات توانایی سلول‌های iPS برای تمایز به سلول‌های چربی، سلول‌های iPS بوسیله IBMX، دگزامتازون، انسولین، indomethacin و pioglitazone به سلول‌های چربی تمایز داده

که در قسمت روش‌ها توضیح داده شده است، القا شده و کارایی سلول‌های تمایز یافته به وسیله رنگ آمیزی Alizarin Red برای ته نشست‌های کلسیمی اندازه گیری شد.

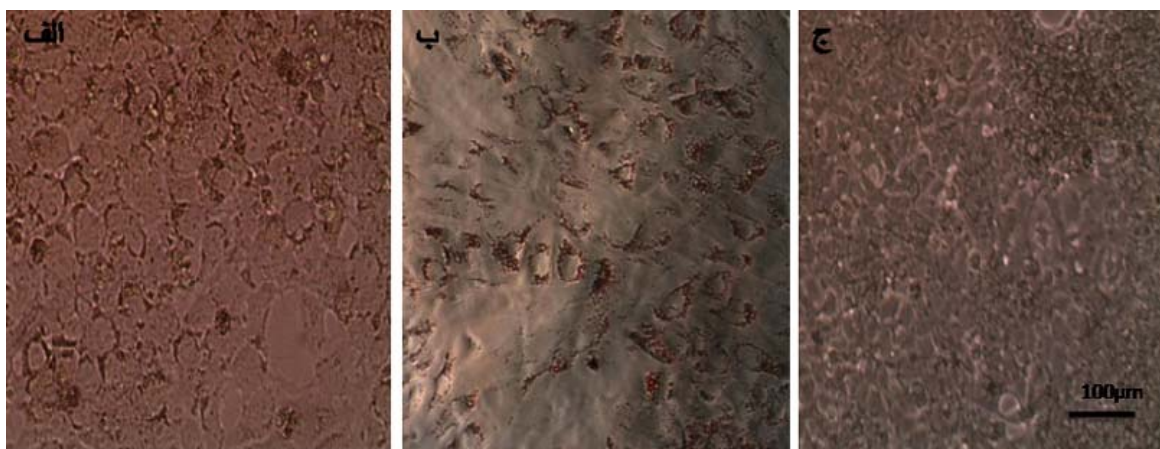
این کشت هر روز با میکروسکوپ معکوس مشاهده شد. اولین نشانه‌های تغییرات ریخت شناسی و تمایز به استخوان یک هفته پس از القای تمایز مشاهده شد. نتایج ما نشان داد که بیشتر سلول‌هایی که به سلول‌های استخوانی تمایز داده شده



شکل ۱. الف - مورفولوژی سلول‌های تمایز نیافته hiPS با بزرگنمایی 40X. سلول‌های بنیادی hiPS، کلونی‌های نسبتاً پهن و مترامی را می‌سازند. این سلول‌ها هسته درشت و سیتوپلاسم کمی دارند و در هسته یک یا چند هستک مشخص دیده می‌شود. ب- مورفولوژی اجسام جنینی حاصل از سلول‌های تمایز نیافته hiPS با بزرگنمایی 10X. اجسام جنینی حدود چهار روز بعد از کشت به صورت توده‌های گرد، معلق و با حاشیه‌های مشخص و منظم دیده می‌شوند.



شکل ۲. بررسی تمایز سلول‌های hiPS به سلول‌های استخوانی. الف- سلول‌های hiPS تیمار شده با محیط تمایزی استخوان ساز به مدت ۲۱ روز. تعداد فراوانی توده در ظرف کشت قابل مشاهده بود. ب- سلول‌های hiPS تیمار شده با محیط تمایزی استخوان ساز. سلول‌ها از نظر ترشح ماتریکس معدنی با روش آلیزارین قرمز ارزیابی شدند که حاصل آن قرمز شدن ماتریکس تولید شده به وسیله سلول‌های تیمار شده است. شکل ج- نمونه کنترل که سلول‌ها در معرض محیط معمولی فاقد مواد القا کننده تمایز به استخوان قرار داشتند، توده‌های سلولی تشکیل نشدند و این کشت با آلیزارین قرمز رنگ نشد. بزرگنمایی 40X.



شکل ۳. بررسی تمایز سلول‌های hiPS به سلول‌های چربی. الف- سلول‌های hiPS تیمار شده با محیط تمایزی چربی ساز به مدت ۲۱ روز که از نظر مورفولوژی اغلب سلول‌ها حاوی قطرات چربی هستند. ب- رنگ آمیزی سلول‌های تیمار یافته با رنگ اوایل رد. قطرات چربی، به دنبال رنگ آمیزی اوایل رد، قرمز رنگ شدند. ج- نمونه کنترل که در آن سلول‌ها به مدت ۲۱ روز در محیط فاقد مواد القا کننده چربی قرار داده شدند و قطرات چربی تشکیل نشد. بزرگنمایی 40X.

در این تحقیق، توان تمایز سلول‌های hiPS را به دو رده سلولی یعنی سلول‌های استئوبلاست و آدیپوبلاست مورد بررسی قرار دادیم و نتایج حاصل نشان داد که سلول‌های hiPS از نظر تمایزی قادرند با فراهم شدن شرایط مناسب در محیط آزمایشگاه، به رده‌های استخوانی و چربی تمایز یابند.

امروزه بیماری‌های درگیر کننده بافت‌های مختلف بدن به سرعت در حال گسترش هستند. روش‌های درمانی و دارویی که امروزه رایج هستند، در صورت موفقیت عمدتاً تنها به آهسته شدن فرایند بیماری کمک کرده و موجب بهبودی بیمار نمی‌شوند. سلول درمانی تکنیک جدیدی است که برای درمان بسیاری از بیماری‌ها می‌توان استفاده کرد. وجود منابع مناسب سلولی با قدرت تمایزی به سلول‌های تخصص یافته یکی از مسائل مهم برای استفاده از این تکنیک است. برای رسیدن به این منظور، تاکنون سلول‌های متنوعی مطرح شده‌اند. سلول‌های بنیادی مانند سلول‌های بنیادی مزانشیمال (MSC)، سلول‌های بنیادی خون‌ساز (HSC)، سلول‌های بنیادی پیش‌ساز چند توان بالغین (MAPC)، سلول‌های بنیادی خون بند ناف (UCBSC) و سلول‌های بنیادی جنینی (ESC) توانایی تمایز به سلول‌های مختلف را دارند (۱۵، ۱۶). این انواع سلولی به خاطر در دسترس نبودن و روش‌های تهاجمی استخراج و در بعضی موارد توانایی تکثیر پایین با محدودیت مواجه هستند.

شدند. رنگ آمیزی Oil Red تاکید کننده سنتز فراوان لیپیدها و تری‌گلسریدها در سلول‌های iPS تمایز داده شده است (شکل ۳). این نتایج با هم تایید می‌کنند که سلول‌های iPS تولید شده سلول‌های پرتوانی بوده که توانایی تمایز به سلول‌های استخوانی و چربی را دارند. بررسی بیان mRNA مارکرهای استخوانی و چربی در سلول‌های تمایز یافته با استفاده از qRT-PCR در مورد سلول‌های hiPS تمایز یافته به سلول‌های استخوانی نشان دهنده بیان ژن‌های استئوپونتین و استوکلسین بود که در مقایسه با نمونه کنترل به طور معنی‌داری افزایش بیان را نشان داد (نمودار ۱). نتایج حاصل از qRT-PCR در مورد سلول‌های hiPS تمایز یافته به سلول‌های چربی نشان دهنده بیان ژن‌های LPL و PPAR بود که در مقایسه با نمونه کنترل به طور معنی‌داری افزایش بیان را نشان داد (نمودار ۱).

بحث

استئوژن و آدیپوژن پروسه‌های تکاملی به شدت کنترل شده‌ای هستند که تعداد زیادی از عوامل بیرونی مثل هورمون‌ها، فاکتورهای رشد، مسیرهای پیام رسان و فاکتورهای رونویسی در آنها دخالت دارند. یکی از روش‌های مرسوم برای به اثبات رساندن توان تمایزی هر رده جدید سلولی، بررسی توان تمایز به انواع سلول‌های لایه‌های جنینی است و یکی از متداول‌ترین روش‌ها، بررسی توان تمایز به رده‌های مزانشیمی، شامل سلول‌های استئوبلاست و آدیپوبلاست است (۱۴). بنابراین ما

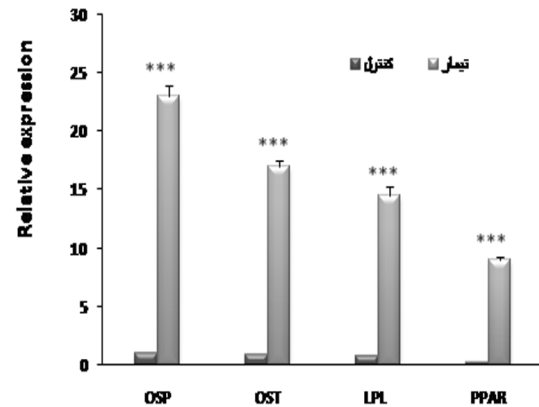
مختلف انتخاب می‌شوند (۷، ۱۹). در سال ۲۰۰۷، برای اولین بار سلول‌های iPS از سلول‌های بالغ انسانی بدست آمد. در ژوئن ۲۰۰۷، چندین گروه تحقیقاتی در دانشگاه‌های معتبر دنیا به صورت جداگانه و موفقیت آمیزی reprogramming سلول‌های فیبروبلاست موشی را به سلول‌های iPS نشان دادند. این سلول‌ها اغلب به وسیله وکتورهای رتروویروسی با چهار فاکتور Sox2, Oct4, Klf و c-Myc به وجود آمدند و بعد از تزریق این سلول‌ها به بلاستوسیست، موش‌های کایمریک (chimeric) تولید شد (۶، ۷، ۲۰).

این سلول‌ها همانند سلول‌های بنیادی جنینی توان تمایز به تمام سلول‌های بدن یک موجود را دارند و استفاده از این سلول‌ها به علت امکان تهیه آنها از بدن فرد بیمار و در نتیجه عدم دفع پیوند و عدم وجود مشکلات اخلاقی به سرعت گسترش یافته است و مطالعات زیادی برای تمایز سلول‌های iPS به انواع مختلف سلول‌ها، از جمله سلول‌های بتا، هیپاتوسیت‌ها، سلول‌های عصبی و قلبی تا به امروز گزارش شده است (۲۴-۱۲).

در این مطالعه ما برای آغاز مسیر تمایزی بر تشکیل اجسام جنینی از سلول‌های iPS تاکید داشتیم. تشکیل اجسام جنینی به دلیل اینکه سبب افزایش تمایز به سلول‌های مختلف می‌شود و همچنین به دلیل تقلید از تخصص یابی لایه‌های جنینی در طی جنین‌زایی دارای اهمیت است (۱۹، ۲۵) و بنابراین ما از اجسام جنینی برای تمایز به سلول‌های استئوبلاست و آدیپوبلاست استفاده کردیم. روی هم رفته می‌توان گفت که سلول‌های hips همانند سایر رده‌های سلول‌های پرتوان قادرند با فراهم شدن شرایط مناسب در محیط آزمایشگاهی به سلول‌های رده‌های استخوانی و چربی تمایز یابند.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از همه دوستانی که ما را در انجام این پروژه یاری رساندند، تشکر می‌کنند.



نمودار ۱. آنالیز بیان ژن‌های استئوژنز و آدیپوژنز مشتق شده از سلول‌های hiPS با روش Real-time quantitative PCR (Q-PCR) که میزان بیان ژن‌های مورد نظر نسبت به میزان HPRT نرمال شده است و سپس بیان ژن در سلول‌های hiPS گزارش شده است. داده‌ها به صورت میانگین \pm انحراف معیار نشان داده شده‌اند. نتایج حاصل از qRT-PCR در مورد سلول‌های hiPS تمایز یافته به سلول‌های استخوانی نشان دهنده بیان ژن‌های استئوپونتین و استئوکلسین است که در مقایسه با نمونه کنترل به طور معنی داری افزایش بیان را نشان می‌دهد. نتایج حاصل از qRT-PCR در مورد سلول‌های hiPS تمایز یافته به سلول‌های چربی نشان دهنده بیان ژن‌های LPL و PPAR است که در مقایسه با نمونه کنترل به طور معنی داری افزایش بیان را نشان می‌دهد. علامت *** نشان دهنده تفاوت معنی‌دار ($p < 0.001$) در مقایسه با گروه‌های دیگر است. تحلیل آماری میزان معنی‌داری، توسط آزمون ANOVA و پس‌آزمون Tukey انجام شد. تعداد تکرار = ۳ (n=3).

همچنین سلول‌های بنیادی مزانشیمی افراد مسن به خاطر ظرفیت محدود تکثیرشان در محیط کشت کارایی چندانی ندارند (۱۷). یکی از منابع سلولی جدید در دنیای امروز، سلول‌های بنیادی iPS هستند که تاکنون قدرت تمایزی این سلول‌ها به رده‌های مختلف چربی، استخوان، غضروف، نورون و ... مورد بررسی قرار گرفته است (۱۸). با توجه به اینکه سلول‌های بنیادی iPS قدرت تمایزی به سلول‌های رده‌های مختلف را دارد، روش تهیه آنها نسبتاً ساده بوده، مسئله رد پیوند و مشکلات اخلاقی را به دنبال ندارند و همچنین قدرت تکثیر مناسب دارند؛ بر همین اساس برای تمایز به سلول‌های

REFERENCES

1. Baharvand H, Hashemi SM, Kazemi Ashtiani S, Farrokhi A. Differentiation of human embryonic stem cells into hepatocytes in 2D and 3D culture systems in vitro. *Int J Dev Biol* 2006;50:645-52.
2. Tavakol S, Aligholi H, Gorji A, Eshaghabadi A, Hoveizi E, Tavakol B, et al. Thermogel nanofiber induces human endometrial-derived stromal cells to neural differentiation: In vitro and in vivo studies in rat. *J Biomed Mater Res A* 2014;102:4590-7.

3. Quail DF, Siegers GM, Jewer M, Postovit LM. Nodal signalling in embryogenesis and tumourigenesis. *Int J Biochem Cell Biol* 2013;45:885-98.
4. Hoveizi E, Khodadadi S, Tavakol S, Karima O, Nasiri-Khalili MA. Small Molecules Differentiate Definitive Endoderm from Human Induced Pluripotent Stem Cells on PCL Scaffold. *Appl Biochem Biotechnol* 2014;173:1727-36.
5. Hoveizi E, Nabiumi M, Parivar K, Ai J, Massumi M. Definitive endoderm differentiation of human-induced pluripotent stem cells using signaling molecules and IDE1 in three-dimensional polymer scaffold. *J Biomed Mater Res A* 2014;102:4027-36.
6. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 2006;126:663-76.
7. Ohmine S, Squillace KA, Hartjes KA, Deeds MC, Armstrong AS, Thatava T, et al. Reprogrammed keratinocytes from elderly type 2 diabetes patients suppress senescence genes to acquire induced pluripotency. *Aging* 2012;4:60-73.
8. Pouya A, Satarian L, Kiani S, Javan M, Baharvand H. Human induced pluripotent stem cells differentiation into oligodendrocyte progenitors and transplantation in a rat model of optic chiasm demyelination. *PLoS one* 2011;6:e27925.
9. Hosoya M, Kunisada Y, Kurisaki A, Asashima M. Induction of differentiation of undifferentiated cells into pancreatic beta cells in vertebrates. *Int J Dev Biol* 2012;56:313-23.
10. Yamanaka S. Elite and stochastic models for induced pluripotent stem cell generation. *Nature* 2009;460:49-52.
11. Hori Y. Insulin-producing cells derived from stem/progenitor cells: therapeutic implications for diabetes mellitus. *Med Mol Morphol* 2009;42:195-200.
12. Noguchi H. Recent advances in stem cell research for the treatment of diabetes. *World J Stem Cells* 2009;1:36-42.
13. Zaehres H, Scholer HR. Induction of pluripotency: from mouse to human. *Cell*. 2007;131:834-5.
14. Tavakol S, Azami M, Khoshzaban A, Ragerdi Kashani I, Tavakol B, Hoveizi E, et al. Effect of laminated hydroxyapatite/gelatin nanocomposite scaffold structure on osteogenesis using unrestricted somatic stem cells in rat. *Cell Biol Int* 2013;37:1181-9.
15. Farzaneh Z, Pournasr B, Ebrahimi M, Aghdami N, Baharvand H. Enhanced functions of human embryonic stem cell-derived hepatocyte-like cells on three-dimensional nanofibrillar surfaces. *Stem Cell Rev* 2010;6:601-10.
16. Bi D, Chen FG, Zhang WJ, Zhou GD, Cui L, Liu W, et al. Differentiation of human multipotent dermal fibroblasts into islet-like cell clusters. *BMC Cell Biol* 2011;11:46.
17. Stojanovic I. IPS cells from diabetes mellitus type 1 for disease modeling and therap 2009.
18. Massumi M, Hoveizi E, Baktash P, Hooti A, Ghazizadeh L, Nadri S, et al. Efficient programming of human eye conjunctiva-derived induced pluripotent stem (ECiPS) cells into definitive endoderm-like cells. *Exp Cell Res* 2014;322:51-61.
19. Hosoya M. Preparation of pancreatic beta-cells from human iPS cells with small molecules. *Islets* 2012;4:249-52.
20. Christodoulou C, Longmire TA, Shen SS, Bourdon A, Sommer CA, Gadue P, et al. Mouse ES and iPS cells can form similar definitive endoderm despite differences in imprinted genes. *J Clin Invest* 2011;6:2313-25.
21. Kai D, Prabhakaran MP, Jin G, Ramakrishna S. Guided orientation of cardiomyocytes on electrospun aligned nanofibers for cardiac tissue engineering. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2011;98:379-86.
22. Orlova Y, Magome N, Liu L, Chen Y, Agladze K. Electrospun nanofibers as a tool for architecture control in engineered cardiac tissue. *Biomater* 2011;32:5615-24.
23. Chayosumrit M, Tuch B, Sidhu K. Alginate microcapsule for propagation and directed differentiation of hESCs to definitive endoderm. *Biomater* 2009;31:505-14.
24. Gao N, LeLay J, Vatamaniuk MZ, Rieck S, Friedman JR, Kaestner KH. Dynamic regulation of Pdx1 enhancers by Foxa1 and Foxa2 is essential for pancreas development. *Genes Dev* 2008;22:3435-48.
25. Meng ZX, Wang YS, Ma C, Zheng W, Li L, Zheng YF. Electrospinning of PLGA/gelatin randomly-oriented and aligned nanofibers as potential scaffold in tissue engineering. *Mat Sci Eng* 2010;30:1204-10.