

مهندسی بافت در دندانپزشکی بازساختی

گردآوری و ترجمه:

دکتر نغمه بهرامی (دانشیار گروه مهندسی بافت دانشگاه علوم پزشکی تهران)

دکتر محمد بیات (استاد گروه جراحی دهان و فک و صورت دانشگاه علوم پزشکی تهران)

دکتر جعفر آی (استاد گروه مهندسی بافت دانشگاه علوم پزشکی تهران)

دکتر عبدالرضا محمد نیا (دانشیار گروه پزشکی مولکولی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی)

دکتر شیوا شیرازیان (استادیار گروه بیماری‌های دهان دانشگاه علوم پزشکی تهران)

دکتر امین خواجهی (دانشجوی فلوشیپ دندانپزشکی بازساختی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی)

سید حسین حسینی (دانشجوی phd مهندسی بافت دانشگاه علوم پزشکی تهران)

سرشناسه	: ودینگتن، ریچل ج. (Waddington, Rachel (Rachel J)
عنوان و نام پدیدآور	: مهندسی بافت در دندانپزشکی بازسازی/اوبراستاران ریچل ج. ودینگتن، الستر ج. اسلون؛ گردآوری و ترجمه نغمه بهرامی ... [و دیگران].
مشخصات نشر	: تهران: شایان نمودار، ۱۴۰۲.
مشخصات ظاهری	: ۱۸۹ ص.: مصور.
شابک	: ۹۷۸-۹۶۴-۲۳۷-۷۱۰-۷
وضعیت فهرست نویسی	: فیبا
یادداشت	: عنوان اصلی: Tissue engineering and regeneration in dentistry : current strategies, 2017.
یادداشت	: گردآوری و ترجمه نغمه بهرامی، محمد بیات، جعفر آی، عبدالرضا محمدنیا، امین خواجوی، سیدحسین حسینی، شیوا شیرازیان.
یادداشت	: کتابنامه.
موضوع	: بافت‌ها - مهندسی، Tissue engineering، دندانسازی - مواد، Dental materials
شناسه افزوده	: اسلون، الستر ج.
شناسه افزوده	: Sloan, Alistair J
شناسه افزوده	: بهرامی، نغمه، ۱۳۵۸ - مترجم
رده بندی کنگره	: RK۳۲۰
رده بندی دیویی	: ۶۱۷/۶۳۴۰۵۹۲
شماره کتابشناسی ملی	: ۹۴۵۲۹۸۷

نام کتاب: مهندسی بافت در دندانپزشکی بازسازی

گردآوری و ترجمه: دکتر نغمه بهرامی، دکتر محمد بیات، دکتر جعفر آی، دکتر عبدالرضا محمدنیا، دکتر شیوا شیرازیان، دکتر محمدمین خواجوی، سید حسین حسینی
ناشر: انتشارات شایان نمودار
مدیر تولید: مهندس علی خزعلی
حروفچینی و صفحه‌آرایی: انتشارات شایان نمودار
طرح جلد: آتلیه طراحی شایان نمودار
شمارگان: ۵۰۰ جلد
نوبت چاپ: اول
تاریخ چاپ: زمستان ۱۴۰۲
شابک: ۹۷۸-۹۶۴-۲۳۷-۷۱۰-۷
قیمت: ۴,۳۰۰,۰۰۰ ریال



شایان نمودار

دفتر مرکزی: تهران / میدان فاطمی / خیابان چهلستون / خیابان دوم / پلاک ۵۰ / بلوک B / طبقه همکف / تلفن: ۸۸۹۸۸۸۶۸



وب سایت: shayannemoodar.com



اینستاگرام: Shayan.nemoodar

(تمام حقوق برای ناشر محفوظ است. هیچ بخشی از این کتاب، بدون اجازه مکتوب ناشر، قابل تکثیر یا تولید مجدد به هیچ شکلی، از جمله چاپ، فتوکپی، انتشار الکترونیکی، فیلم و صدا نیست.

این اثر تحت پوشش قانون حمایت از مولفان و مصنفان ایران قرار دارد.)

مقدمه

پیشرفت علوم خدمات بسیاری به بشریت انجام داده است، به شکلی که کیفیت زندگی انسان در دنیای امروز قابل مقایسه با گذشته نیست، بخش بزرگی از بیماری ها کنترل شده اند کیفیت زندگی بهتر شده است. متوسط عمر انسان ها تا ۴ سال افزایش یافته است و امید می رود این بهبودی هر روز بیشتر و بیشتر باشد اگر چه هنوز راه درازی در پیش است اما امیدها هر روز پر رنگ تر می شوند. وجه مشترک همه پیشرفت های علمی گذشته کشف و شناخت پدیده های طبیعی، علمی و کاربرد آنها در کنترل بیماری ها و بهبود وضعیت زندگی بشر و همچنین تکنولوژی پیشرفته بوده است.

در سال های اخیر با ظهور وجوه جدیدی از دانش و تکنولوژی شرایط به سرعت در حال تغییر است به شکلی که نه فقط شناخت پدیده ها و کاربرد آنها مهم است بلکه به نوعی شناخت عمیق تر و در سطح مولکولی پدیده آمده و بشر توانمندی مداخله و تغییر در روند پدیده های طبیعی را به دست آورده است و این توانمندی روز به روز در حال گسترش و فرجه تر شدن می باشد. بیوتکنولوژی، نانوتکنولوژی، ژنتیک، توان ویرایش ژنی و پزشکی بازساختی از این دست تحولات مهم و ارزشمند هستند. شکی وجود ندارد که از دست دادن دندان ها و بافت های مجاور نگر دهنده آن یکی از مشکلات قدیمی بشر بوده است و همچنان در دنیای جدید هم از چالش های پیش روی انسانها و سیستم های سلامت است. اگرچه رشته دندانپزشکی با گسترش خود توانسته تا حد زیادی از رنج بشر در این زمینه را بکاهد. اما عمده تمرکز بر جایگزینی نسوج از دست رفته با مواد دندانپزشکی بوده است. در دندانپزشکی بازساختی (regenerative dentistry) تلاش بر این است نسوج از دست رفته با نسج طبیعی جایگزین شوند و یا نسج طبیعی جدید تولید و مورد استفاده قرار گیرد.

در کشورمان دانشمندان و همکاران ارزشمندی در این زمینه تربیت شده اند اینجانب افتخار داشتم در طی مسئولیت خود در دانشکده دندانپزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران برای اولین بار در کشور رشته بالینی فلوشیپ دندانپزشکی بازساختی را با کمک دانشکده محترم فناوری نوین و رئیس محترم جناب آقای دکتر احمدیان و مدیر گروه محترم آقای دکتر آی در این دانشکده راه اندازی نمایم، همت بلند سرکار خانم دکتر بهرامی و پیگیری های سرکار خانم دکتر فرنوش محمدی همکار گرامی اینجانب در این مسیر ستودنی است.

حال که اولین دانشجوی گرامی این دوره همکار ارجمند پرودنتیست آقای دکتر خواجهی در آستانه فارغ التحصیلی هستند یکی از محصولات گرانسنگ این تلاش که کتاب موجود است توسط این همکار عزیز تالیف شده است. تلاش ایشان در روان نویسی و کاربردی بودن برای همکاران عزیز و دانشجویان ارزشمند قابل تقدیر فراوان می باشد. اینجانب به سهم خود ضمن تشکر از همه دست اندرکاران این رشته و نیز آقای دکتر خواجهی مطالعه این کتاب را به همکاران پیشنهاد می نمایم.

با تشکر

محمد بیات

فهرست مطالب

- فصل اول : سلول های بنیادی در مهندسی بافت ۵
- فصل دوم: تنظیم ایمنی با سلول های بنیادی ۲۳
- فصل سوم: رژنراسیون بافت به وسیله سلول های بنیادی پالپ دندان ۵۳
- فصل چهارم: بررسی پتانسیل سلول های بنیادی مزانشیمی در ترمیم استخوان و رژنراسیون در نواحی
کرانیوفاسیال ۷۲
- فصل پنجم: مدل های کشت بافت برای رژنراسیون بافت دندان ۹۸
- فصل ششم: ملزومات صنعتی برای تولید محصولات بر پایه سلول های بنیادی و مهندسی بافت ۱۱۱
- فصل هفتم: مهندسی بافت پریودنتال ۱۲۳
- فصل هشتم: چشم اندازهای پیش رو در رویکردهای کلینیکی برای مدیریت بیماری های دندانی و پریودنتال ۱۴۴
- فصل نهم: ملاحظات تکنیکی مهندسی بافت در بازسازی استخوان آلوئول فک ۱۶۷

فصل اول

معرفی

ای مخاطی به راحتی در دسترس می باشند. سلول‌های بنیادی مزانشیمی دهانی قدرت پرولیفراسیون بالایی دارند به همین دلیل این سلولها به عنوان یکی از بهترین منابع برای تولید iPSCs محسوب می شوند. اگر چه بی ضرر بودن استفاده از iPSCs در کاربرد های کلینیکی هم چنان نیازمند تحقیق است اما استفاده از آن ها جهت سلول درمانی در آینده ممکن است اتفاق بیفتد. در حال حاضر تعداد زیادی از مطالعات در مورد ارائه روش هایی جهت تمایز iPSCs ها به انواع متفاوت سلولی برای اهداف رژنراسیون انجام شده است. در این فصل به پیشرفت های اخیر در این زمینه به خصوص در حوزه نورورژنریس می پردازیم. همچنین استفاده از iPSCs به عنوان ابزاری برای مطالعه ژنتیک و مکانسیم بیماری ها بحث خواهد شد.

استخراج iPSCs

اگر چه روش های مختلفی برای استخراج سلول های بنیادی چند استعداد (Pluripotent stem cells) در پستانداران پیشنهاد شده است اما تلاش ها برای تولید hESCs به وسیله انتقال هسته ای (nuclear transfer) ناموفق بوده است. بلاستوسیت های انسانی تریپلوئید تولید شده اند و قادر به تبدیل به ESCs هستند. ولی به هر حال hESCs های تریپلوئید منابع مناسبی برای کاربرد های کلینیکی نمی باشند. hESCs های به دست آمده با روش parthenoge-netic از سلول ها دارای مزیت و فایده کلینیکی جهت استفاده می باشند. با این وجود این تکنولوژی غیر قابل دسترسی بوده و اجرای آن بسیار مشکل است. Yamana کا و تیمش دریافتند که با استفاده از ۴ فاکتور c-Myc/ klf4/Oct4/Sox2 می توان فیبروبلاست ها را به ES-like cells بازگردانند و واژه ی induced pluripotent cells (iPSCs) را برای آن ها برگزیدند، آن ها از مدل های موش Fbx ۱۵ Bgeo/

سلول های بنیادی القاء شده (iPSCs) از طریق دریافت چهار فاکتور Linez8/Nanog/oct4/ یا c-Myc/klf4/Oct4/Sox2 از طریق وکتورهای ویروسی می توانند از فیبروبلاست های پوستی ایجاد شوند. بری اجتناب از اینتگریشن دائمی ژن های اگزوزن و همچنین وکتورهای حامل آن ها تلاش های قابل توجهی برای خارج کردن ترانس ژن ها و وکتورها از سلول ها پس از reprogramming آن ها به iPSCs صورت گرفته است. به دلیل فعال شدن مجدد ژن های اندوزن چند استعدادی (Pluripotent genes) این ژن های اگزوزن می توانند بدون تأثیر بر شرایط reprogram شده برداشته شوند. برداشت این ژن های اگزوزن iPSCs را به سلول های بنیادی جنینی انسانی (hESCs) بیشتر شبیه می کند.

علاوه بر استفاده از سیستم های وکتورهای ویرال برای reprogram کردن سلول ها سایر روش ها شامل استفاده از پروتئین های recombinant یا mRNA چهار فاکتور تولید iP-SCs مورد استفاده قرار می گیرند. iPSCs کاربردهای زیادی دارند. در این فصل به دژنراسیون بافتی بر پایه سلول و تولید patient specific iPSCs برای مطالعه مکانسیم های بیماری می پردازیم. اگر چه انواع متفاوتی از سلول ها قادر به تبدیل به iPSCs هستند اما فیبروبلاست های پوستی به علت راحتی استخراج و دسترسی شایع ترین رده سلولی هستند که به این منظور مورد استفاده قرار می گیرند. به صورت کلی reprogram سلول های نابالغ راحت تر از سلول های تمایز یافته تر می باشد. از منظر کلینیکی نیز سلول های بنیادی عصبی منابع سلولی مناسبی برای تولید iPSCs نیستند. دهان منبع مناسبی برای سلول های بنیادی مزانشیال (MSCs) است و بافت های مختلف دهانی شامل بافت های پالپ، لثه، مخاط و استخوان آلوئول غنی از این رده سلول ها می باشند. دندان های کشیده شده به عنوان زباله های بیومدیكال محسوب شده و بافت های لثه

با استفاده از یک سیستم موش خصوصیات سلولی مشابه نشان داده شد. همچنین generation تولد سگ های زنده که تا بزرگسالی زنده بودند با iPSCs نشان داده شد (Blond et al ۲۰۰۹, Zhao ۲۰۰۹, kang ۲۰۰۹). میزان موفقیت برای رسیدن به tetraploid complementation با iPSCs تفاوت هایی را نشان می دادند. به طور کلی iPSCs از لحاظ عملکرد و کاربرد مشابه ESCs هستند اگر چه کاملاً شبیه به آنها نیستند بنابراین بررسی خصوصیات سلولی در سطح ژنتیک و اپی ژنتیک باید انجام شود تا کلون های reprogram iPSCs شده در سطح مولکولی بررسی شوند. در مدل هایی انسانی الگوهای بیان ژن Global و پروفایل اپی ژنتیک بین iPSCs و ESCs مشابه بود. با توجه به اینکه طول تلومر iPSCs مجدداً بازگردانده می شود. این موضوع در reprogramming سلول های استخراج شده از بیماران Dys-keratosis congenital (که یک اختلال telomere maintenance است) مورد بررسی قرار گرفت. Reprogramming در این سلول ها علیرغم مشکلات ژنتیکی مربوط به تلومراز منجر به بازیابی طول تلومر در این سلول ها شد (Agrawal ۲۰۱۰).

منابع سلولی برای تولید

فیبروبلاست های پوستی منبع انتخابی برای به دست آوردن iPSCs هستند چرا که این سلول ها همیشه موجود بوده و به راحتی از پوست قابل استخراج می باشند یکی از منابع سلولی دیگر که احتمالاً در دسترس بوده و به سهولت قابل استخراج می باشند حفره دهان است. فیبروبلاست های مخاط دهان می توانند به iPSCs تبدیل شوند. با برداشت مقدار کمی از مخاط دهان بدون بر جای گذاشتن اسکار، می توان مقدار قابل توجهی از سلول های بنیادی مزانشیمال را به دست آورد. سلول های بنیادی هم چنین به راحتی از استخوان فک نیز قابل برداشت می باشند. برداشت استخوان آلوئول از فک تهاجمی می باشد. پروتکل استخراج سلول های بنیادی مزانشیمال از استخوان فک به خوبی تشریح شده است (Mason et al ۲۰۱۴). و گزارش های موجود نشان دهنده ی وجود درد قابل ملاحظه پس از انجام این فرآیند نبود. سلول های خونی یک منبع دیگر برای تولید iPSCs هستند ولی استفاده از این منابع سلولی مستلزم subpopulation isolation و تحریک با فاکتورهای رشدی پیش از فرآیند reprogramming می باشد. لذا این فرآیند پیچیده باعث شده تا سلول های خونی به عنوان یک منبع سلولی در دسترس برای تولید iPSCs مورد توجه قرار نگیرند. بافت های خارج رویانی منابع سلولی مناسبی

به این منظور استفاده کردند. iPSCs در این موش ها مشخصات مشابه سلول های ES (استم سل های امبریونیک) را نشان دادند. در محیط کشت مورفولوژی، سرعت تقسیم و بیان ژن های کلیدی چند استعداد (key pluripotent genes)، پروفایل ژنی (global gene profile)، پروفایل اپی ژنتیک و توانایی تشکیل embryoid body مشابه بوده، علاوه بر این در محیط in-vitro تمایز به انواع سلول های germ layers مشاهده شد. همچنین در in-vivo تشکیل ترانوما حاوی سلول های با منشأ تمام انواع سلول های germ layers نشان داده شد. همچنین پس از تزریق در یک سیستم حیوانی به بلاستوسیت ها تشکیل chimeras مشاهده شد. Yamanaka و تیمش در تحقیقات بعدی نشان دادند که همان چهار فاکتور قبلی شامل c-Myc/klf4/Oct4/Sox2 در انسان ها می تواند در reprogram کردن فیبروبلاست ها به iPSCs موثر باشند که این سلول ها تمامی ویژگی هایی را که iPSCs موش ها به دست آورده بودند را دارا بودند. تنها امکان تشکیل chimeric در انسان قابل آزمایش نبود. گروه Thomason هم به صورت مستقل نشان دادند که چهار هسته ژنی شامل Oct 4, Sox 2, Nonog, ۲۸ قادر به reprogram کردن فیبروبلاست های انسانی به iPSCs هستند. نرخ تولید موفق iPSCs به طور کلی پایین بوده و بالاترین میزان آن در یک مدل حیوانی موش ها با استفاده از منبع سلولی فیبروبلاست جنینی ۰/۱ درصد گزارش شد. Sommer و همکاران با استفاده از وکتور lentiviral که تمام ۴ فاکتور Yamanaka را بیان می کرد reprogramming efficiency ۰/۵٪ درصد را برای فیبروبلاست های استخراج شده از دم موش نشان دادند. در یک مدل انسانی نیز سلول های بنیادی استخراج شده از بافت چربی reprogramming rate ۰/۲ درصد را نشان دادند. به طور کلی به سختی میتوان که یک بازده قطبی را ارائه کرد. چرا که آزمایشگاه های مختلف از سیستم های وکتور متفاوت استفاده می شود و فعالیت های ویرال هم تفاوت قابل توجهی دارد. در مقایسه با سایر سلول های بنیادی چند استعداد انسانی (human pluripotent stem cell) iPSCs ها دارای قابلیت بالقوه برای کاربردهای کلینیکی می باشند.

ویژگی های iPSCs

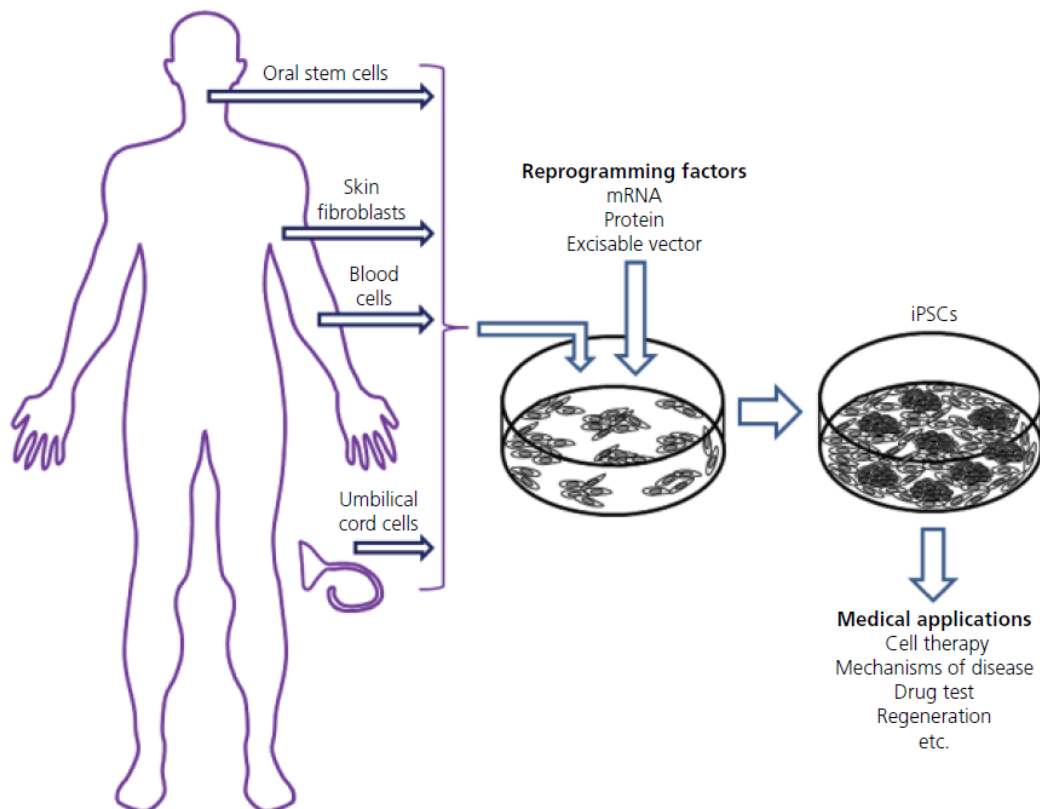
یک مشخصه بارز ESCs به عنوان سلول های بنیادی چند استعداد توانایی تشکیل جنینی است که از طریق Tetraploid complementation می توان به یک موجود زنده تبدیل شود.

کاربرد iPSCs در سلول درمانی

سلول‌های بنیادی بالغین چند توان (Multipotent) هستند و برخی از آن‌ها ویژگی‌های نزدیک به سلول‌های چند استعداد دارند. سلول‌های پرتوان (Pluripotent) مثل سلول‌های بنیادی امبریونیک می‌توانند به تمام انواع سلول‌های بدن تبدیل شوند، در حالی که سلول‌های چند توان (Multipotent) می‌توانند به بیش از یک رده سلولی تبدیل شوند ولی استعداد و قابلیت کمتری نسبت به سلول‌های پرتوان (Pluripotent) دارند. سلول‌های بنیادی بالغین و سلول‌های بنیادی بند ناف از جمله سلول‌های چند توان (Multipotent) به شمار می‌آیند. سلول‌های بنیادی بالغین به سهولت قابل استخراج نیستند و طول عمر محدودی در محیط کشت دارند. Partial reprogramming با تبدیل فیبروبلاست‌ها به رده‌های مشخص سلولی گزینه مناسبی برای کاربرد در سلول درمانی محسوب می‌شود اما محدودیت منابع سلولی و طول عمر کوتاه در محیط‌های برون تنی (invitro) یک مساله اساسی به شمار می‌آید.

برای تولید iPSCs هستند چرا که آن‌ها محتوی سلول‌های نابالغ بوده که برای این هدف بسیار مناسب به نظر می‌رسند. (Jiang ۲۰۱۴, Song ۲۰۱۴) دندان‌های کشیده شده نیز از منابع سلولی مناسب بوده که محتوی سلول‌های بنیادی/پروژنیاتور شبه مزانشیمال می‌باشند.

این سلول‌ها شامل سلول‌های بنیادی پالپ دندان (DPSCs)، سلول‌های بنیادی به دست آمده از دندان‌های شیری اکسفولیو شده (SHED)، سلول‌های بنیادی آپیکال پاپیلا (ACAP) و سلول‌های بنیادی لیگامان پریدنتال (PDLSCs) می‌باشند. این سلول‌ها به طول معمول از کودکان یا بالغین جوان استخراج می‌شوند. SHED از کودکان ۶-۱۲ سال و SCAP و DPSCs از PDLSCs از مولر سوم افراد ۱۶-۲۲ ساله به دست می‌آیند. این گروه سنی دارای سلول‌های بنیادی نابالغ تری بوده که برای تولید iPSCs مناسب‌تر هستند. منابع سلولی قابل استفاده برای تولید iPSCs بدون کاربرد ترانس-ژن یا وکتور و هم چنین کاربردهای مدیکال، هر کدام در شکل ۱-۱ نشان شده است.



شکل ۱-۱: منابع سلولی قابل دسترس برای تولید transgene-free iPSC و کاربردهای کلینیکی آن‌ها. سلول‌های بنیادی دهانی قابل دسترس ترین و راحت ترین سلول‌ها برای فرایندهای reprogramming می‌باشند. سلول‌های بنیادی دهانی در دسترس ترین و ساده ترین سلول‌ها برای فرایندهای reprogramming می‌باشند. استفاده از m-RNA، پروتئین و وکتورها امکان تولید transgene free iPSCs را فراهم می‌کند. توجه: اگرچه به نظر می‌رسد که سلول‌های خونی راحت ترین و قابل دسترس ترین منبع سلولی برای استخراج می‌باشند اما قبل از reprogramming نیازمند انجام فرایندهای پیچیده ای می‌باشند که بسیار دشوار و پیچیده می‌باشد.

اندودرم مرتبط با هیپاتوسیت ها (Gallicano & Mirshra ۲۰۱۰ و Si-Tageb ۲۰۱۰ و Svllivan ۲۰۱۰) مثال هایی از این تلاش ها هستند. مطالعات زیادی هم اکنون جهت مشخص کردن پروتکل های تمایزی برای هدایت iPSCs و ESCs جهت تبدیل به انواع سلولی مشخص و همچنین تعیین دامنه پتانسیل تمایزی لاین ها و کولون های متفاوت سلولی یا روش های مختلف-Reprogram ing در حال انجام است. یکی از مهمترین سوالات این است آیا iPSCs منشأ گرفته از سلول های تمایز یافته عملکرد مشابهی با سلول های طبیعی تشکیل دهنده بافت ها دارند یا خیر (Eftthy-miou ۲۰۱۴).

iPSCs برای مهندسی بافت و رژنراسیون

سلول های درمانی برای رژنراسیون بهترین و تنها گزینه درمانی برای زمانی است که روش های بدون پایه سلولی قابلیت انجام ندارند. iPSCs مشابه ESCs در محیط کشت مدام تحت بازسازی مجدد قرار می گیرند و یک منبع نامحدود برای رژنراسیون در انسان ها hiPSCs می توانند جهت پزشکی بازساختی به انواع متفاوتی از سلول ها تبدیل شوند که در ادامه به مثال هایی از آن اشاره می شود.

رژنراسیون قلبی با iPSCs

hiPSCs می توانند به کاردیومیوسیت های فانکشنال تمایز یابند. تمایز موفقیت آمیز hiPSCs به کاردیومیوسیت ها برای اولین بار در سال ۲۰۰۹ گزارش شد (Zhang ۲۰۰۹). مطالعات الکتروفیزیولوژی نشان دادند که iPSCs میتوانند به فنوتیپ ها نودال، آرتریال و ونتریکولار تمایز یابند و پاسخ به تحریک بتا-آدرنرژیک را نشان دهند. کاردیومیوسیت های تمایز یافته از iPSC از لحاظ عملکرد مشابه کاردیومیوسیت های تمایز یافته از ESC بودند (Zhang ۲۰۰۹). علاوه بر این کاردیومیوسیت های تمایز یافته از hiPSCs به طور موفقیت آمیزی در قلب مدل های حیوانی گرفت شدند (ZWI-Dantsis ۲۰۱۳) و جهت ارتقای فانکشن قلبی پس از کاردیومیوپاتی در مدل خوکی استفاده شدند (Kawamura ۲۰۱۲).

رژنراسیون اسکلتال با iPSCs

مهندسی بافت اسکلتال شامل رژنراسیون استخوان و غضروف است. تمایز استئوژنتیک iPSCs برای رژنراسیون بافت استخوان با استفاده اسکافولدی های پلی کاپرولاکتون دارای کانال های ماکرو (Jin et al ۲۰۱۳) و فیبرین یا هیدروکسی

از لحاظ قابلیت برای رژنراسیون بافتی، پرتوان بودن (Plu-ripotent) سلول های بنیادی جنینی قابل قیاس با سلول های بنیادی بزرگسالان نیستند اما کاربرد سلول های بنیادی جنینی (hESCs) نگرانی های جدی از لحاظ ایمن بودن آن ها را در بردارد چرا که استفاده از hESCs در محیط های درون تنی (in-vivo) در صورت عدم موفقیت جهت تمایز در مسیر صحیح، می توانند منجر به تشکیل تراتوم شود.

یک گزارش مورد از دو بیمار و هم چنین فاز I/II مطالعات بر روی ۱۸ بیمار که از hESCs جهت بازبانی بنیادی استفاده شده بود هیچ عارضه ی مخربی را در فالوآپ ۲۲ ماهه نشان نداد (Schwartz ۲۰۱۵ و Schwartz ۲۰۱۲). تشکیل تراتوم به طور میانگین ۸ هفته طول می کشد. از همین رو تشکیل تومور در آینده در این بیماران نامحتمل می رسد. تاکنون نیز در مطالعات کار آزمایشی بالینی متعددی از سلول های بنیادی جنینی با منشا سلول های اپی تلیالی پیگمانته شبکیه برای پیوند جهت درمان بیماری های دژنراتیو شبکیه استفاده شده است و هیچکدام از بیماران تشکیل تومور را به دنبال درمان مذکور نشان ندادند (Peterson & luring ۲۰۱۴).

مطالعات کار آزمایشی بالینی که توسط Geron جهت درمان صدمات نخاعی به وسیله سلول های بنیادی رویانی (hESCs) انجام شده بود به دلیل مسائل مالی متوقف شد. اگر مطالعات ایمن بودن کاربرد کلینیکی hESCs را ثابت کنند به احتمال زیاد هم ایمن خواهند بود. مطالعات مداخله بالینی پیش رو با iPSCs این مسئله را مورد تایید قرار خواهد داد (Cryanoski ۲۰۱۳). اخیرا نشان داده شده که کاشت h-iPSCs با منشا سلول های بنیادی عصبی می توانند منجر به ارتقای axonal sparing، رشد مجدد و آنژیوژنز شود و از طرفی از دمیلینه شدن پس از صدمات نخاعی جلوگیری کند و منجر به بهبود بازیابی عملکرد در مدل های حیوانی mar-moset بدون تشکیل تومور شود (Kobayashi ۲۰۱۲). هدایت تمایز hESCs به سلول های مختلف به دقت در محیط برون تنی (in-vitro) مورد آزمایش قرار گرفته است و پروتکل ها متعددی نیز تدوین شده است. این پروتکل ها برای تمایز مورد استفاده قرار گرفته است. مسیرهای تمایزی متعددی برای هدایت iPSCs به دودمان های سلولی مشخص از هر سه لایه جنینی مورد آزمایش قرار گرفته اند (Eftthymiovetal. ۲۰۱۴). سلول های عصبی با منشا اکتودرمال (Hv ۲۰۱۰ و cai ۲۰۱۰)، سلول های هماتوپوئیک با منشا مزودرمال و سلول های اندوتلیال (Choi & Feng ۲۰۱۰) و سلول های ماهیچه ای (Mizuno ۲۰۱۰)، سلول های

که در شکل ۲-۱ نشان داده شده است (Otsu ۲۰۱۲). در مدل بازسازی و کاشت جوانه دندانی miPSC قادر بودند تا در رژنراسیون استخوان آلوئولار و پالپ دندان در محیط درون تنی شرکت کنند (Wen ۲۰۱۲). iPSCs انسانی مشتق از سلول‌های اپی تلیال در ترکیب با سلول‌های مزانشیمال دندانی موش در محیط درون تنی ساختارهای شبه دندانی را ایجاد کردند (Lio ۲۰۱۳, Cai ۲۰۱۴). این یافته‌ها پیشنهاد می‌کند که iPSCs می‌تواند یک منبع سلولی موثر جهت مطالعات رژنراسیون دندانی و تکامل دندان باشد. سلول‌های سوماتیک بیمار پس از استخراج به patient-specific iPSCs reprogram می‌شوند و پس از آن جهت تشکیل سلول‌های اکتودرمال اپی تلیال و سلول‌های مزانشیمی شبه نورال کرسی القاء می‌شوند و پس از آن جهت تشکیل سلول‌های ادنتوژنیک در محیط برون تنی القاء می‌گردند. این دو جمعیت سلولی به وسیله تماس مستقیم با یکدیگر ترکیب می‌شوند که به نوعی شبیه سازی in-vivo arrangement است. تعادل این سلول‌ها منجر به تکامل جوانه دندانی در مراحل اولیه می‌شود زمانی که این جوانه دندانی کاشته می‌شود منجر به تکامل یک دندان فانکشنال خواهد شد (Otsu et al. ۲۰۱۴).

رژنراسیون عصبی با iPSCs

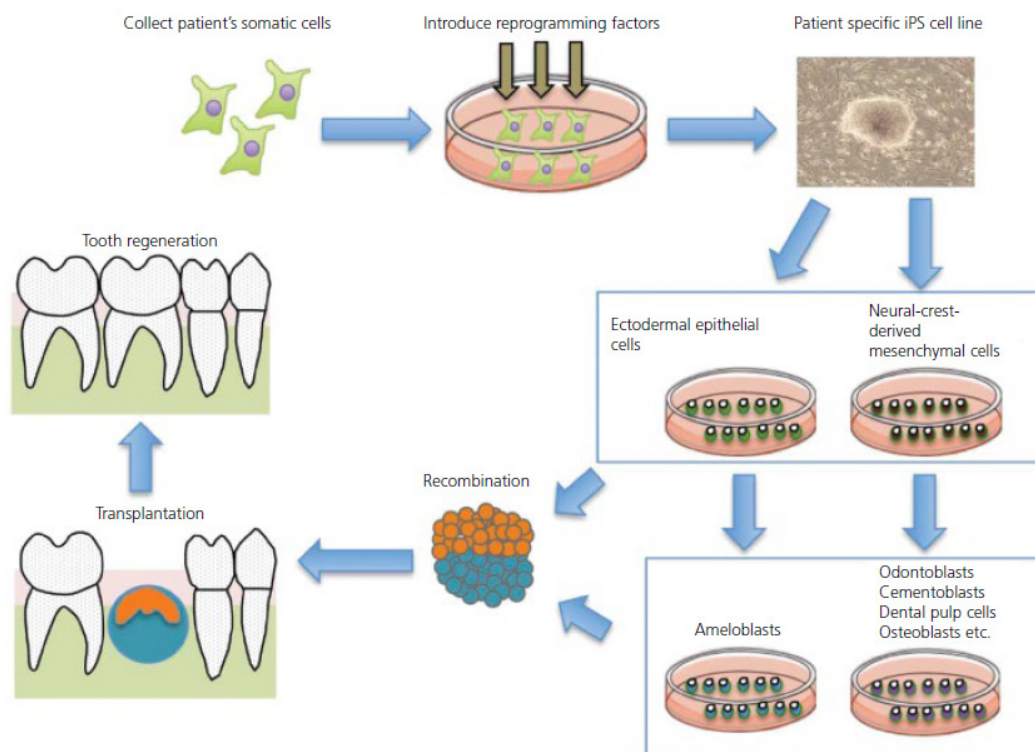
چشم انداز درمانی خیلی از اختلالات نورولوژیک به معرفی درمان‌های برپایه سلول بستگی دارد. یک مثال خوب برای این دسته از بیماری‌ها، بیماری پارکینسون است. این بیماری یک اختلال مزمن پیشرونده دژنراتیو نورونی است که به صورت اولیه با از دست رفتن قابل توجه نورون‌های دوپامینرژیک مشخص می‌شود. در یک proof of principal experiment که از مدل موشی استفاده کرده بود iPSCs ابتدا به پیش سازهای سلولی نورون تمایز پیدا کرده و سپس به داخل مغز جنین موش ترانسپلنت شدند. این سلول‌های بدست آمده از iPSCs به نواحی مختلف مغز مهاجرت کرده و به ساب تایپ‌های مختلف نورونی شامل GABAergic, Catecholaminergic, glutamatergic تبدیل می‌شوند (Wering ۲۰۰۸). این نورون‌های گرفت شده به بلوغ فعالیت عصبی خود رسیدند و از لحاظ عملکردی با ساختار مغز میزبان تطابق پیدا کرده و با آن آمیخته شدند. iPSCs به دست آمده از نورون‌های دوپامینی پس از ترانسپلنت به مدل‌های رت‌های بیماری پارکینسون باعث ارتقای عملکرد شدند (Soldner ۲۰۰۹).

آپاتیت B تری کلسیم (park & Im ۲۰۱۳) گزارش شده است. تمایز استنوژنتیک hiPSCs میتواند به وسیله EB forma-tion (Ardeshir Lajmi et al ۲۰۱۳) یا بدون مرحله EB formation با استفاده از فاکتورهای استنوژنتیک، آسکوربیک اسید، β گلیسروفسفات و دگزامتازون انجام شود. برپایه مطالعات iPSCs، in-vitro خصوصیات مشابه hESCs در تمایز استنوژنتیک دارند (Ardeshirylam jimi et al ۲۰۱۳). تشکیل استخوان in-vitro به وسیله iPSCs همچنین در رت‌ها و nude mice نشان داده شد (Dvon ۲۰۱۱). مطالعات همچنین نشان داده اند که hiPSCs در ترکیب با ژل محتوی آملوژنین یک وسیله مناسب برای مهندسی بافت پریدنتال جهت ارتقای تشکیل آلوئولار، سمنتوم و پریدنتال لیگامان جدید می‌باشد (Dvon ۲۰۱۱). مهندسی بافت غضروف نیز با استفاده از iPSC گزارش شده است (Diekman ۲۰۱۲). تمایز کندروژنیک قوی iPSC با استفاده از BMP4 در محیط mi-cromass مشاهده شده است. در یک مدل برون تنی آسیب غضروفی، سلول‌های شبه کندروسیتی تمایز یافته از iPSC باعث ارتقا الحاق بافت‌های نو ظهور به غضروف بالغ شده بودند (Diekman ۲۰۱۲).

علاوه بر تمایز مستقیم از iPSCs، استئوبلاست‌ها (Vil-۲۰۱۲ la-Diaz) و کندروسیت‌ها (Koyama ۲۰۱۳) می‌توانند از گونه iPSCs که با محیط رشد MSCها تطابق دارند حاضر شوند. MSCs می‌توانند از iPSCs که Embryoid body تشکیل داده و مارکرهای سطحی MSCs را بیان می‌کنند، به وجود آیند. این سلول‌ها پتانسیل تمایز به آدیپوسیت‌ها، کندروسیت‌ها، و استئوبلاست‌ها را دارند (Tang ۲۰۱۴).

رژنراسیون دندان با iPSC

iPSCs توانایی تمایز به بافت‌های داخل دهانی شامل اپی تلیال و مزانشیمال دندانی را دارند. miPSC که با لاین سلول‌های اپی تلیال دندانی کشت شده بودند مارکرهای آملوبلاست شامل آملوبلاستین و اناملین را نشان دادند (Arakaki ۲۰۱۲). miP-SC قابلیت تمایز به سلول‌های شبه نورال کرسی را داشته (Lee ۲۰۰۷) و اگر با اپی تلیوم دندانی همزمان کشت داده شوند می‌توانند مارکرهای سلولی مزانشیمال را بیان کنند (Otsu ۲۰۱۲). اگر سلول‌های شبه نورال کرسی در محیط کشت اپی تلیوم دندانی موش کشت داده شوند تمایز آن‌ها به ادونتوبلاست ارتقاء می‌یابد (Otsu ۲۰۱۲). این یافته‌ها منجر به پیشنهاد یک پروتکل جهت رژنراسیون دندان با استفاده از iPSC شد



شکل ۱-۲: شکل شماتیک که استراتژی رژنراسیون کامل دندانی با استفاده از iPSCs نشان می دهد. سلول های سوماتیک بیمار استخراج شده و پس از reprogramming به iPSC اختصاصی بیمار تبدیل می شوند که پس از آن می توانند برای تبدیل به سلول های اکتودرمال اپی تلیالی و سلول های مزانشیمی با منشأ نورال کرسست القا شوند. هم چنین می توانند پس از آن به سلول های ادونتوژنیک in-vitro تبدیل شوند. این دو رده سلولی را می توان مشابه آرایش آن ها در محیط In-vivo در تماس مستقیم با یکدیگر قرار داد. تعامل این سلول ها با یکدیگر می تواند منجر به تشکیل جوانه اولیه دندانی شود. که پس از کاشت در ناحیه بی دندانی این ساختار نوترکیب به یک دندان فانکشنال تمایز می یابد.

جداسازی روزت است یا حتی با استفاده از پروتکل کشت سلولی چرخشی به افزایش همگنی EB. چهار نوع کلنی می توانند در مرحله روزت از iPSC ها ایجاد شوند، یعنی کلونی هایی با ساختار روزت، کلونی ها با نورون های متمایز، کلونی ها با میوفیبروبلاست ها و تعداد کمی از آنها تمایز نیافته است. آرایش سلولی منحصر به فرد از سلول های اپیتلیال یادآور مقاطع عرضی در حال توسعه لوله عصبی هستند و به عنوان یک مشخصه در نظر گرفته می شود. القای عصبی موفق این کلونی های روزت برای نشانگرهای تاج عصبی $AP-2$ ، $nes-$ و tin و $p75$ ممکن است برای بازسازی عصبی استفاده شود. درمان به موقع با مورفوژن های خاص مانند Shh و $Wnts$ یا آگونیست های آنها/ آنتاگونیست ها، هویت منطقه ای سلول های پیش ساز به سرنوشت شکمی یا دمی را تغییر جهت می دهد و منجر به روش های بسیاری برای تولید متفاوت می شود. در زیر گروه های عصبی نشان داده شده است که iPSC ها به نورون های دوپامینرژیک، نورون های حرکتی متمایز می شوند.

hiPSC می توانند به نورون های حرکتی تمایز پیدا کرده و بازدهی مشابه با نورون های به دست آمده از hiPSCs داشته باشند. اخیراً یک گزارش بر روی یک مدل از رت ها نشان داد که ترانس پلنت سلول های پیش ساز نورال به دست آمده از trans-gene/vector-free hiPSCs به مغز موش که دچار آسیب ناشی از سکته ایسکمیک شده بود منجر به ارتقای فانکشنال در دوره بازیابی شد. (Mohammad ۲۰۱۳)

پروتکل های بازسازی عصبی با استفاده از iPSC ها

تمایز آزمایشگاهی iPSC ها به سلول های عصبی با استفاده از رویکردهای مختلف به دست آمده است. سه روش اصلی عبارتند از (خلاصه شده در جدول ۱، ۱): (الف) EB روش تشکیل و جداسازی (روزت، ب) SMA دوگانه روش تشکیل و جداسازی روزت (ج) روش مهار، و روش SFEB (کشت دانه های شبه EB بدون سرم)

(الف) تشکیل EB و روش جداسازی روزت

یک رویکرد محبوب و قدرتمند برای بسیج تمایز iPSC/ ESC از طریق یک دودمان عصبی، روش تشکیل EB و

جدول ۱،۱ پروتکل های تمایز عصبی ESCs/iPSCs

پروتوکول	روش کشت	برنامه تمایز	مرجع
تشکیل EB و جداسازی روزت Dual-SMAD بازدارنده SFEBq	تشکیل EB در تعلیق و پیروی از محیط کشت چسبنده EBs کشت تک سلولی چسبنده از iPSC های جدا شده تشکیل شبه EB با تجمع مجدد iPSC های جدا شده	القا و جداسازی عصبی روزت های بدون مورفوژن مهار سیگنال های BMP/Nodal مهار سیگنال های WNT/BMP/Nodal	(Zhang et al., 2001) Chambers et al., 2009; Morizane (et al., 2011 Mariani et al., 2012b; Watanabe (et al., 2005; Watanabe et al., 2007

توجه: EB توده جنینی: SFEBq. کشت بدون سرم دانه های شبه EB، روش سریع. منبع: اقتباس از کیم و همکاران، ۲۰۱۴.

(ب) روش بازداری دوگانه SMAD

توده ها را تشکیل می دهند. اندازه تعریف شده در محیط های کشت و بازدارنده های Wnt، Dkk1 و آنتاگونیست سیگنالینگ LeftyA برای هدایت سلول ها به سمت تمایز عصبی وجود دارند. لذا سلول ها را می توان بیشتر به زیر جمعیت های دودمان عصبی با عوامل رشد مختلف هدایت کرد. بعداً این پروتکل روی hESCs اجرا شد و برای افزایش بقای سلول ها مجبور به استفاده از مهارکننده ROCK شدند. در طول کشت با پروتکل اصلاح شده هما نظور که در شکل ۱،۵ نشان داده شده است hESCs و hiPSC ها به سلول های منفرد تفکیک می شوند و اجازه تشکیل دانه های شناور شبیه EB در حضور Dkk1، LeftyA و BMPRIA-Fc، و به دنبال آن اتصال مجدد روی ظروف / چاه های روکش دار داده می شود. تحت تحریک تمایزی بیشتر، جمعیت های مختلف نوروں ها در پاسخ به سیگنال های خاص ظاهر می شوند. مثلاً، درمان Shh برای ventralization منجر به افزایش جمعیت سلول های NKx2.1+ (ناحیه پایه از تلنسفال) در بین سلول های BF1+ می شود.

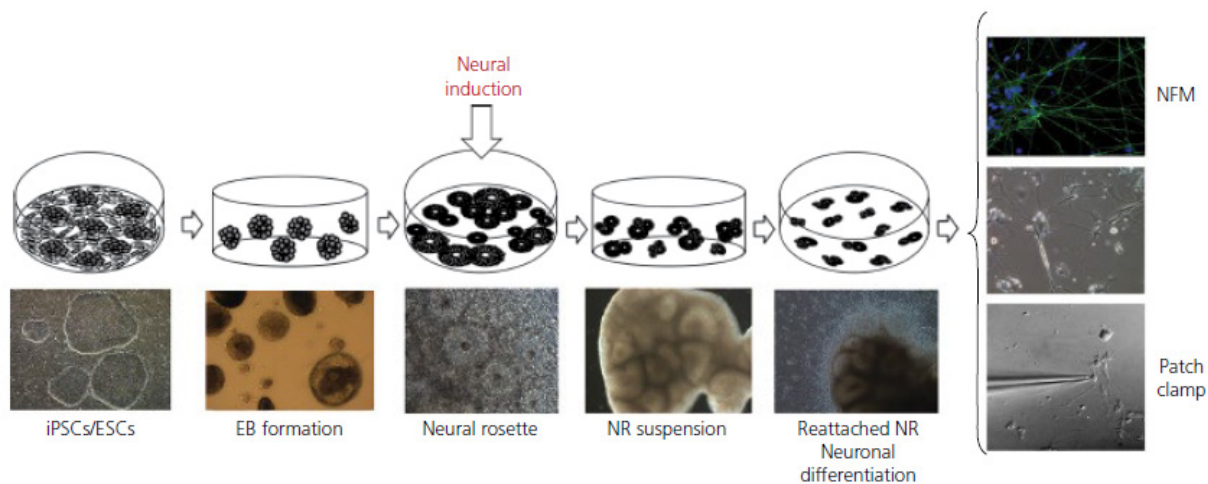
iPSC ها به عنوان مدل های مطالعه بیماری

iPSC ها را می توان از بیماران مبتلا به بیماری های خاص تولید کرد. iPSC های تولید شده می توانند تقلیدی از فنوتیپ بیماری در *in-vitro* و *in-vivo* باشند و برای این منظور یک کتابخانه iPSC بیمار که می تواند مورد استفاده قرار گیرد، ایجاد شود. برای مطالعه مکانیسم های بیماری و توسعه داروی جدید iPSC های تولید شده از سلول های بیماران مبتلا به هاجینسون سندرم پروجریا گیلفورد، ناشی از یک نقطه جهش در ژن لامین A (LMNA) منجر به ارائه پاتوژنز این بیماری در *in vitro* و فنوتیپ بیماری در سطح سلولی و مولکولی می شود.

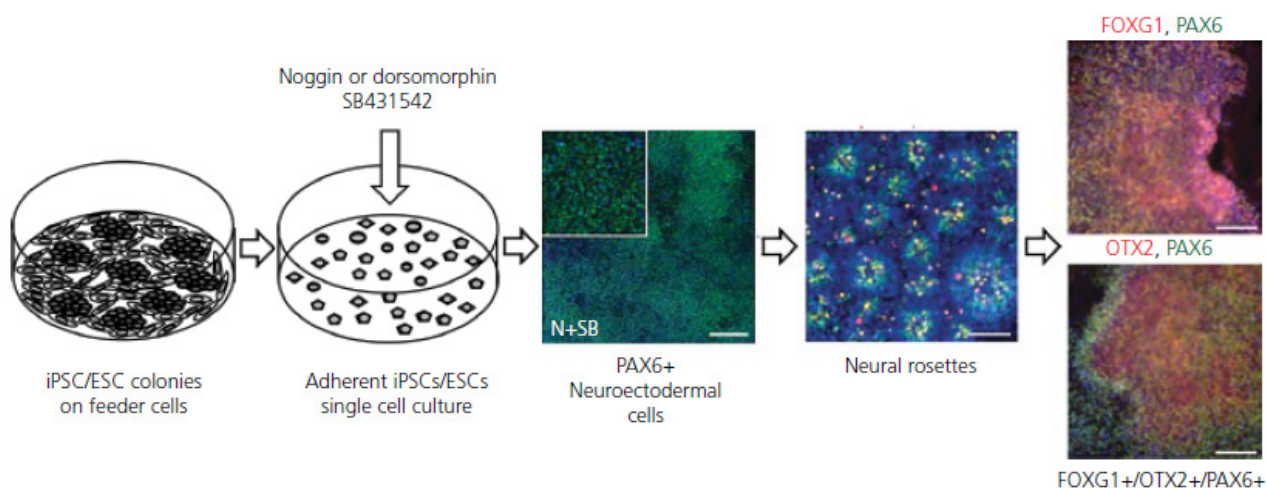
نمایشی از روش بازداری دوگانه SMAD در شکل ۱،۴ نشان داده شده است. چمبرز و همکاران (۲۰۰۹) ابتدا این روش را با استفاده از hESCs/hiPSCs گزارش کردند. در اینجا hESCs/iPSCs به عنوان کشت های چسبنده برای تمایز سلول های عصبی اکتودرمی به سلول های منفرد جدا شده و رشد می کنند. در روز یازدهم سلول های PAX6+ ظاهر می شوند و روزت های عصبی را تشکیل می دهند. تمایز بعدی به سلول های عصبی که بیانگر PAX6، BF1 (FOXP1) و OTX2 هستند منجر به هویت تلنسفالی پشتی می گردد. با اندکی تغییر در این پروتکل، iPSC ها قادر به تبدیل به نوروں های دوپامینرژیک هستند. با افزودن مهارکننده سیگنالینگ BMP دورسومورفین و یک مهارکننده سیگنالینگ TGF- β /کتیوین/گره SB431542 به کشت های تک سلولی iPSCs/ESC ها تبدیل می گردد. این روش به عنوان مهار دوگانه SMAD شناخته می شود و نشان داده شده است که تمایز عصبی بسیار کارآمد را ترویج می کند. زیرا پروتئین های SMAD به عنوان مبدل سیگنال درون سلولی در هر مسیر سیگنالینگ به کار می گیرد. ترکیبات مولکولی کوچک دورسومورفین و SB431542 پایدار و مقرون به صرفه هستند و این روش ممکن است یک استراتژی امیدوارکننده برای تولید کنترل شده نوروں ها در پزشکی بازساختی فراهم کند.

(ج) روش شبه Eb بدون سرم (SFEB)

در روش SFEB با استفاده از mESCs که از کلونی های ESC جدا می شوند به سلول های منفرد اجازه رشد در حالت تعلیق داده می شود. تقریباً ۹۰٪ از سلول ها به طور خود به خود



شکل ۱،۳: نورون‌زئیس با واسطه جسم امبریوئید. کلونی های iPSC/ESC به حالت سوسپانسیون درآمده تا اجسام امبریوئید را تشکیل دهند. پس از آن در محیط کشت حاوی $bFGF$ و $N2$ قرار می گیرند تا روزت های نورال را تشکیل دهند. سلول های روزت نورال تعدادی از مارکرهای سلول های عصبی را شامل $nestin$ ، $Musashi-1$ و polysialylated neuronal cell adhesion molecule بیان می کنند. روزت های نورال سپس جدا شده و در سوسپانسیون رشد می کنند و به دنبال آن به ظروف laminin-coated اتصال مجدد پیدا می کنند و تحت شرایط تحریکی نورونیک قرار می گیرند تا جهت ارزیابی فانکشنال از طریق الکتروفیزیولوژی patch clamp مورد بررسی قرار گیرند.

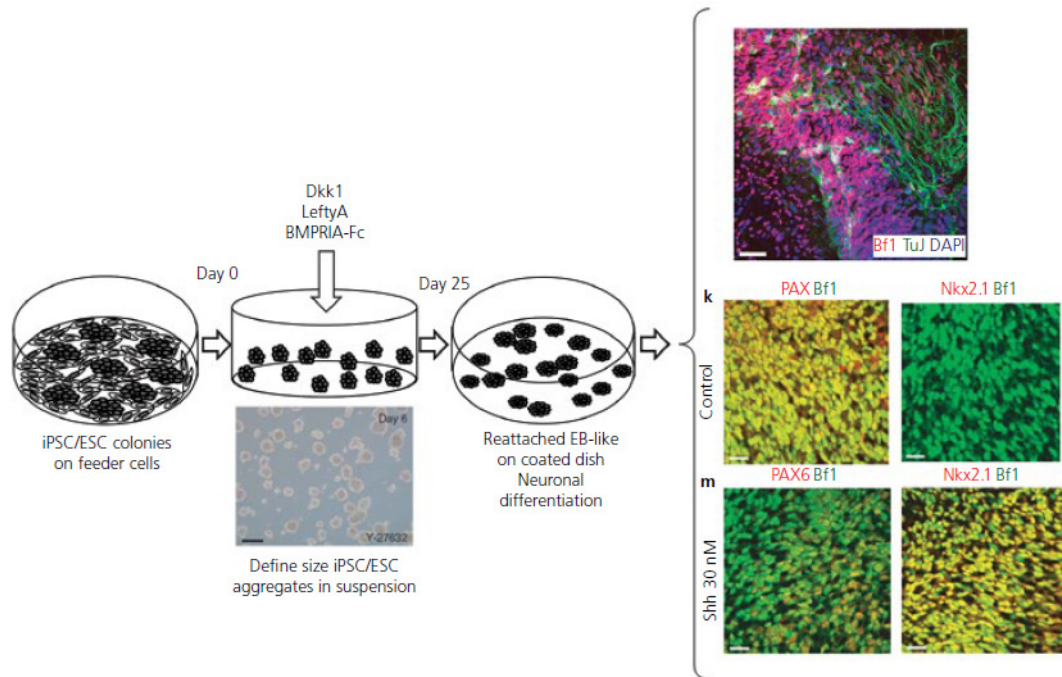


شکل ۱،۴: روش مهار Dual-SMAD برای تمایز عصبی. در شرایط بدون سرم، کشت تک سلول چسبنده iPSCs/hESCs تحت اثر *Noggin* یا *dorsomorphin* (مهارکننده BMP) و SB431542 (مهارکننده Activin/Nodal)، تا سلول های iPSCs/hESCs به سلول های نوراکتودرمال مثبت از نظر *PAX6* (سبز) تبدیل شوند که در نهایت ۱۱ روز پس از تمایز روزت های نورال را تشکیل می دهند (Ki67, green phosphor- histone H3, red). سلول های عصبی ایجاد شده *FOXG1* (قرمز)، *OTX2* (قرمز) و *PAX6* (سبز) را بیان می کنند.

بیماری ژنتیکی

اصلاح نقص ژنتیکی *ex vivo* نیز استفاده شود به طوری که ممکن است سلول های صحیح به بیمار پیوند زده شود. در مورد بیماری هانتینگتون، iPSC های این بیماران می تواند حامل ژن هانتینگتین جهش یافته (mHTT) باشد و به NSC ها یا سلول های پیش ساز عصبی تمایز یابد. بیان mHTT در NSC و NPC می تواند با استفاده از RNAi یا الیگونوکلوئوتیدهای آنتی سنس خاموش شوند سپس سلول های اصلاح شده را می توان به سلول های مغز بیمار برای پر کردن جمعیت سلولی از دست رفته پیوند زد.

پارک و همکاران (۲۰۰۸) یک کتابخانه iPSC از بیماران مبتلا به انواع بیماری های ژنتیکی وراثت مندلی یا پیچیده ایجاد کرد. مثالها عبارتند از کمبود شدید آدنوزین دامیناز نقص ایمنی ترکیبی، شوآچمن-بودیان-سندرم الماس، عضلانی دوشن و بکر دیستروفی، بیماری پارکینسون، بیماری هانتینگتون، دیابت نوع ۱ و سندرم داون/ تریزومی ۲۱. iPSC های تولید شده از بیماران مبتلا به اختلالات تک ژنی نه تنها می توانند برای مطالعه مکانیسم های بیماری استفاده شود بلکه می تواند برای



شکل ۱.۵: روش Serum-free EB-like (SFEB) برای تمایز عصبی. کلونی های iPSC/ESC ($10^5 \times 2$ cells/mL) در ظروف غیر چسبیده کشت می شوند. سلول ها در حضور مهارکننده ROCK جمع می یابند. Dkk1 (مهارکننده Wnt)، LeftyA (مهارکننده سیگنالینگ نودال) و soluble BMPRIA-Fc (آنتاگونیست BMP4) از روز ۰ تا ۲۴ به محیط کشت اضافه می شوند. سلول ها تجمع می یابند و سپس به صورت enblock بر روی ظروف پوشش داده شده با poly-D-lysine، لامینین و فیبرونکتین در محیط کشت تمایز عصبی (Neurobasal + B27 and glutamine) تا روز ۲۵ کشت می شود. برای آزمایشات ventralisation، Shh اضافه می شود.

ریزی کردند. سلول های با منشاء اندودرمی از جمله مری، معده، کولورکتال، کبد، پانکراس و کلانژیوسلولار سلول های سرطانی. iPSC-های برنامه ریزی شده مجدداً بیان الگوهای مورفولوژیکی اکتودرم، مزودرم، و آندودرم، که در سلول های والدین بیان نشده بود را نشان دادند. این iPSC های سرطانی تکثیر کند، حساسیت در برابر درمان القا کننده تمایز و کاهش تومورزایی در موش های NOD/SCID را نشان دادند. علاوه بر این، بیان ژن P16 سرکوبگر تومور (INK4A) در سلول های سرطانی پرتوان القایی (iPC) در حالی که بیان آن در سلول های iPC تمایز یافته افزایش یافته است) سرکوب شد. یافته ها نشان می دهد که فعال شدن مجدد ژن های سرکوبگر تومور با برنامه ریزی مجدد ممکن است در افزایش حساسیت شیمیایی به 5-FU و رگرسیون تکثیر سلولی و تهاجمی تحت القای تمایز نقش داشته باشد. سلول های سرطانی می توانند به طور بالقوه مجدداً به چند توانی برنامه ریزی شده و قادر به تمایز به دودمان سلولی متعدد از هر سه لایه زایا باشد. از این رو سلول های سرطانی به سلول هایی با تحریک سیستم ایمنی بسیار بالا تبدیل می شوند. در نتیجه سلول های دندریتیک ارائه دهنده آنتی ژن تومور برای سرطان یک امکان مناسب برای ایمونوتراپی می باشد.

برای بیماری های ژنتیکی مربوط به سیستم های خون ساز، در یک مدل موش کم خونی داسی شکل، iPSCs جهش یافته تولید شده در شرایط آزمایشگاهی از فیبروبلاست های موش بیمار می تواند تولید و به دنبال آن تمایز اصلاح شود. iPSC ها از بیماران مبتلا به اختلالات عصبی مختلف، از جمله سندرم رت، سندرم X شکننده، سندرم آنجلمن، سندرم تیموتی، بیماری آلزایمر خانوادگی و بیماری پارکینسون جدا سازی شده اند. iPSC ها می توانند به عنوان ابزاری برای مطالعه مورد استفاده قرار گرفته اند. مثلاً، اختلال رشد عصبی مرتبط با X، سندرم رت (RTT)، با استفاده از iPSC ها مورد مطالعه قرار گرفته است.

سرطان – iPSCs

برنامه ریزی مجدد سلول های سرطانی خاص به پرتوان حالت به دنبال تمایز به دودمان های مختلف ممکن است به توسعه واکسن سرطان کمک کند، و در دارو یا غربالگری، برای درک بیولوژیکی استفاده شود. ماهیت سلول های سرطانی به عنوان مثال، سلول های KBM۷ مشتق شده از لوسمی میلوئید مزمن دوباره برنامه ریزی شده اند به iPSC ها. این iPSC های سرطانی، برخلاف سلول های KBM۷ والدین، کاملاً در برابر داروی درمانی ایماتینیب مقاوم بودند میوشی و همکارانش (۲۰۱۰) سلول های سرطانی را دوباره برنامه

پروتکل ۱،۱ برنامه ریزی مجدد سلول‌های بنیادی مزانشیمی دهان به iPSC های عاری از ژن (براساس سامر و همکاران، ۲۰۱۰؛ زو و همکاران، ۲۰۱۲).

مواد

• ناقلان لنتی ویروسی - hSTEMCCA-LoxP (EMD Millipore Corporation. USA. <http://www.emdmillipore.com/US/en/life-science-research/search> /سیستم‌های کشت سلولی/تحقیق سلول‌های بنیادی/برنامه‌ریزی مجدد سلولی/ stemcca/AV2b.qB.Zj4AAAE_c08RHeO2/nav
 • کیت ترانسفکشن TransIT-HelaMonster، Madison، WI، USA. (Mirus، Madison، WI، USA)
 • سلول‌های تغذیه کننده فیروبلاست های جنینی موش (MEF) مقاوم به پورومایسین (USA، MD، Rockville، GlobalStem، DR4 MEF)

۱. تهیه سلول‌های بنیادی مزانشیمی دهان

• تقریباً ۱۰۵ سلول (پاساژ >۵) را در چاهک های صفحات ۱۲ چاهی بکارید (یا صبر کنید تا حدود ۷۰٪ - ۸۰٪ با سلول پر شوند). سلول‌ها باید علائم معمولی سلول‌های بنیادی مزانشیمی دهان با سرعت تکثیر سریع (زمان دو برابر شدن جمعیت ~ ۲۰ ساعت) را نشان می دهد.

۲. تهیه و افزودن مخلوط ویروس

• ذوب ویروس ذخیره شده در دمای ۸۰- درجه سانتیگراد روی یخ.
 • ۰.۵ یا ۱ میلی لیتر محیط کشت تازه برای هر چاهک در یک لوله جداگانه آماده کنید.
 • ویروس (تیتراهای ویروسی ~ $10^8 \times$ TU [واحد انتقال دهنده]/mL) را با پیپتینگ ملایم به لوله اضافه کنید تا مخلوط شود.
 (ناقل‌های لنتی ویروسی hSTEMCCA-LoxP-یک ناقل منفرد پلی سیسترونیک حامل هر چهار فاکتور باز برنامه ریزی انسانی Sox2، Oct4، Klf4، c-Myc)
 • پلی برن را به غلظت نهایی ۴-۵ میکروگرم بر میلی لیتر اضافه کنید.
 • محیط کشت را از چاه خارج کنید، سلول‌ها را یک بار با PBS بشویید.
 • مخلوط ویروسی را به چاه اضافه کنید. به مدت ۱۲ تا ۲۴ ساعت انکوبه کنید، سپس به محیط تازه تغییر دهید.

۳. آماده سازی سلول‌های تغذیه کننده (MEFs)

• ظرف (۱۰ سانتی متر) را با ژلاتین ۰،۱ درصد بپوشانید.
 • MEFs (فیروبلاست‌های جنینی موش در پاساژ >۳ یا ۴ به عنوان سلول‌های تغذیه کننده که با میتومایسین C تیمار شده‌اند. تکثیر آنها را غیرفعال کنید) در ظرف حدود ۱-۲ روز قبل بکارید.

۴. سلول‌های تبدیل شده را به MEF بکارید

• ظرف ۶ روز پس از افزودن ویروس، سلول‌ها را به لایه تغذیه کننده منتقل کنید. سلول‌ها را در صورت پاساژ به چاه های جدید منتقل کنید.
 • سلول‌های تبدیل شده را جدا کرده و مجدداً در محیط کشت سلولی تازه معلق کنید و ۱-۵ $\times 10^4$ سلول تبدیل شده را در محیط کشت سلولی بکارید.
 ظرف ۱۰ سانتی متری با سلول‌های تغذیه کننده (MEFs)، در صورت نیاز به برنامه ریزی مجدد، سلول‌های ترانسدود شده اضافی را برای استفاده احتمالی منجمد کنید.

• روز بعد، محیط را به محیط انسانی (hESC حاوی ۴) FGF نانوگرم در میلی لیتر) تغییر دهید.
 • محیط hESC را یک روز در میان تغییر دهید تا زمانی که کلونی های شبیه ESC ظاهر شوند.
 • کلنی های شبیه ESC باید ظرف ۳۰ روز ظاهر شوند. اگر بعد از ۴۰ روز کلنی مشابه ESC وجود نداشته باشد، شکست خورده در نظر گرفته می شود.

۵. کلونی های iPSC را ساب کلون کنید

• هر کلنی شبیه ESC را به صورت دستی در یک چاه جدید (صفحه ۱۲ چاهی) حاوی MEF انتخاب کنید.
 • iPSC ها را گسترش دهید و برخی را فریز کنید.

۶. آماده سازی برای برش ژن‌ها با Cre

• روز ۱: iPSC ها را به DR4-MEF در چاهک های صفحات ۶ چاهی منتقل کنید. سعی کنید تعداد کلنی ها را قبل از مرحله بعدی کنترل کنید تا به حدود ۶۰٪ - ۷۰٪ سلولی برسید.
 • روزهای ۲ تا ۴: وضعیت سلول‌ها را مشاهده کنید: میزان پرشدگی سلول، اندازه کلنی و تعداد. انجام عمل اکسیژینون زمانی که اندازه کلنی است متوسط است
 • ۴ روز: قبل از برداشتن با واسطه Cre از iPSC عکس بگیرید.
 • ۷ برش ژن‌ها با واسطه Cre برای یک چاه از صفحات ۶ چاهی
 • TransIT-Hela و MONSTER از کیت ترانسفکشن را به دمای اتاق گرم کنید، قبل از استفاده به آرامی هم بزنید.
 • ۲۵۰ میکرولیتر DMEM/F۱۲ در یک لوله ۵۰-mL استریل قرار دهید. ۲،۵ میکروگرم DNA (پلاسمید pHAGE2-Cre-IRES-PuroR) اضافه کنید، به آرامی پیپت کنید.

۷.۵ میکرولیتر Trans IT Hela را اضافه کنید، به آرامی پیپت کنید. ۵ میکرولیتر MONSTER اضافه کنید، به آرامی پیپت کنید. به مدت ۳۰ دقیقه در RT انکوبه کنید.

۲.۵ میلی لیتر در چاه محیط hESC اضافه کنید. ۲،۵ میلی لیتر از مخلوط فوق را به هر چاه اضافه کنید. زمان را ثبت کنید.
 • پس از ۲۴ ساعت، چاه را با PBS یکبار به آرامی بشویید. به محیط hESC تغییر دهید و حدود ۶ ساعت انکوبه کنید.

۸. انتخاب کلنی های iPSC با پورومایسین

• در طول دوره ۶ ساعته، محیط hESC حاوی PURO PUROMYCIN: ۱،۲ (μg/mL) را آماده کنید.
 • پس از ۶ ساعت، محیط را به محیط hESC با PURO به هر چاهک تغییر دهید. زمان را ثبت کنید.
 • پس از ۲۴ ساعت، به محیط hESC تازه با PURO تغییر دهید.
 • سلول ها را با PURO به مدت ۴۸ ساعت درمان کنید. پس از ۴۸ ساعت درمان PURO، سلول ها را با PBS یک بار به آرامی بشویید. به hESC تغییر دهید. به طور متوسط چند ساعت پس از درمان PURO، کلنی ها شروع به مردن می کنند.
 • بعد از درمان PURO عکس بگیرید. محل کلنی ها باقیمانده را در زیر چاه علامت گذاری کنید (برای ثبت این موارد کلنی ها آنهایی نیستند که دوباره ظهور می کنند). محیط کشت را روزانه چک کرده و تغییر دهید.
 • تقریباً در روزهای ۲ تا ۴، کلنی های کوچک جدید باید از لبه کلنی قبلی که از بین رفته بود، دوباره بیرون بیایند. علامت گذاری کنید و از کلنی های جدید عکس بگیرید
 • روزهای ۱۱ تا ۱۴، کلنی های تازه پدید آمده را روی لایه های تغذیه کننده MEF جدید سابکلون کنید و گسترش سلولی را آغاز کنید.

۹. تأیید برداشت ترانس ژن

• استخراج DNA ژنومی از هر ساب کلون و انجام PCR برای تشخیص وجود یا عدم وجود تراریخته.
 • پرایمرهای PCR به شرح زیر است (c-MYC پرایمر پیشرو): 5'-GGA ACT CTT GTG CGT AAG TCG ATA G-3';
 WPRE (پرایمر معکوس): 5'-GGA GGC GGC CCA AAG GGA GGA GAT CCG-3';
 • مراحل PCR: ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۳ دقیقه. به دنبال آن ۳۳ چرخه ۹۴ درجه سانتی گراد برای ۳۰ ثانیه، ۶۰ درجه سانتی گراد برای ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه.
 • محصولات PCR توسط الکتروفورز بر روی ژل آگارز بررسی شدند.

۱۰. بررسی عدم ادغام پلاسمید erC

• کلون های iPSC بدون ترانس ژن بر روی MEFs DR۴ در حضور (۱،۲ میکروگرم در میلی لیتر) PUROMYCIN رشد می کنند. مرگ کلی سلولی عدم ادغام پلاسمید در ژنوم نشان می دهد.

پروتکل ۱،۲ نورونز سلول های بنیادی پرتوان (براساس هو و همکاران، ۲۰۱۰، و زو و همکاران، ۲۰۱۲)

مواد

محیط hESC: DMEM/F12, 20% FBS/KOSR, 1% NEAA, 1 mM L-glutamine, 0.1 μM β-mercaptoethanol, 4 ng/mL bFGF
 محیط نورونیک A: DMEM/F12, NEAA 1X, N2 1X, Noggin (500 ng/mL), SB4352 (10 nM)
 محیط نورونیک B: DMEM/F12, NEAA 1X, N2 1X, Noggin (500 ng/mL)
 محیط نورونیک C: DMEM/F12, NEAA 1X, N2 1X, Noggin (500 ng/mL), Retinoic acid (0.1 μM)
 محیط نورونیک D: DMEM/F12, NEAA 1X, N2 1X, Retinoic acid (0.1 μM), SHH (100 ng/mL)

۱. کشت hESCs/iPSCs

• hESCs/iPSCs ها روی یک لایه تغذیه کننده از MEF های غیرفعال شده با تغییر روزانه محیط hESC کشت می شوند.

۲. تشکیل توده جنینی (EB).

• محیط را از روی صفحه کشت سلولی آسپیره کنید. دو بار با PBS بشویید.
 • سلول ها را با کلاژناز IV (۱ میلی گرم در میلی لیتر) درمان کنید. به مدت ۱۵ تا ۲۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه کنید تا کلنی های سلولی جدا شوند.
 • به آرامی پیپت کنید تا کلنی ها جدا شوند. سلول ها را در یک لوله مخروطی جمع کنید.

• مایع رویی را بردارید و سلول ها را به آرامی با ۵ میلی لیتر محیط hESC بدون bFGF، بشویید (-)hESC. به مدت ۱ دقیقه با سرعت ۵۰۰ دور در دقیقه بچرخید.

• سلول ها را در ۳،۵ میلی لیتر در چاه (صفحه ۶ چاه) از محیط hESC (-) معلق کنید. سلول ها را با پیبت کردن به آرامی بالا و پایین بشکنید.
• سلول ها را در صفحات ۶ چاهی با اتصال فوق العاده کم با غلظت ۱۰۵ سلول در سانتی متر مربع قرار دهید (تخمین زده شده با هضم مقداری iPSC/ESC کلنی ها به سلول های منفرد و شمارش) اجازه می دهد تا کلنی های سلولی در محیط شناور شوند. هر روز محیط (-)hESC را تغییر دهید. پس از ۲ روز، کلنی های سلولی تجمع یافته و EB را تشکیل می دهند، به مدت ۷ روز ادامه می یابد.

۳. تمایز عصبی مرحله اول - تشکیل روزت عصبی (NR).

• EB ها را جمع آوری کنید و به مدت ۳۰ ثانیه با سرعت ۱۰۰۰ دور در دقیقه بچرخانید. EB ها را مجدداً در محیط (-)hESC معلق کنید.
• EB ها را داخل چاهک های با پوشش ماتریژل قرار دهید تا امکان اتصال EB به ماتریژل فراهم شود.
• EBs را به مدت ۱۴ روز با محیط القای عصبی DMEM تکمیل شده با B۲۷ و ۲۰ نانوگرم در میلی لیتر bFGF متصل کرد. نیمی از محیط ها را هر ۲ روز یکبار عوض کنید و هر هفته یک تغییر رسانه کامل انجام دهید.
• پس از ۱۵ روز کشت، خوشه های NR باید ظاهر شوند.

۴. جداسازی و کشت روزت های عصبی (NR) در حالت تعلیق

• NR ها را با خودکار نشانگر زیر میکروسکوپ علامت گذاری کنید.
• با یک قیچی استریل، ته چند نوک پیبت را ببرید. ژله نفتی را روی لبه برش نخورده بمالید و روی NR های جداگانه قرار دهید برای تشکیل چاه های شبیه سازی فردی.
• NR ها را به آرامی تریتور کرده و آنها را آسپیره کنید. NR ها را به چاه های صفحات اتصال فوق کم ۲۴ چاهی منتقل کنید ۵~ NR در هر چاه، NR ها خوشه های بزرگی را تشکیل می دهند
• NR ها را به صورت سوسپانسیون با محیط عصبی (هدایت سلول ها به سلول های پیش ساز عصبی) برای ۲۵ روز آینده با محیط کشت ۴ مرحله زیر:
• در طول این دوره، خوشه های بزرگ (بیش از ۳۰۰ میکرومتر) را با نوک پیبت بریده شده به آرامی خرد کنید.

۵. تمایز به سمت یک فنوتیپ نورونوزنیک

• برای سنجش پچ گیره، خوشه را به آرامی جدا کرده و چند سلول را روی یک لیز شیشه ای گرد پوشیده شده با پلی لیزین بکارید.
• کشت سلول ها در محیط Neurobasal (با مکمل ۱x N۲)، ۱ میکرومولار cAMP محیط پایه
• برای تمایز نورون های حرکتی موارد زیر را به محیط پایه اضافه کنید BDNF / ۱۰ نانوگرم در میلی لیتر/ GDNF ۱۰ نانوگرم در میلی لیتر IGF۱/ ۱۰ نانوگرم در میلی لیتر. هفته ای دوبار محیط را عوض کنید.
• تا ۵ هفته ادامه دهید. تغییرات مورفولوژیکی را مشاهده کنید و سلول های شبه نورون را جستجو کنید.
• انجام تجزیه و تحلیل بیان ژن عصبی و تجزیه و تحلیل الکتروفیزیولوژی.

ملاحظات پیش بالینی

iPSC های عاری از ژن های تراریخته/وکتور

Cre-recombinase قابل برداشت سیستم ناقل ویروسی که برای تولید iPSC های دندانانی استفاده شده است را به عنوان روش سازگار، کارآمد و قابل اعتماد نشان می دهد.

حافظه iPSC ها به عنوان مزیت بالقوه

همانطور که قبلاً بحث شد، برنامه ریزی مجدد سلول ها به iPSC ها ناقص بوده و مقداری DNA باقیمانده ای به جا می گذارد. علایم متیلاسیون مربوط به سلول منشا آنها، "حافظه اپی ژنتیک" نامیده می شود. این حافظه اپی ژنتیک iPSC ها را با تمایل بیشتری برای تمایز به دودمان نوع سلول اصلی نسبت به دودمان جایگزین نشان می دهد. اگرچه، در سیستم موشی، چنین حافظه ای وجود دارد این حافظه عمدتاً در iPSC ها بین پاساژهای ۴ و ۶، محو می شوند و توسط پاساژ ۱۰ دور می شود و به طور کامل در پاساژ ۱۶ حذف می شود.

رویکردهای مختلفی برای تولید iPSC های عاری از ژن/ وکتور ایجاد شده است که شامل بیان گذرا با استفاده از ناقلان آدنووویروسی یا غیر ویروسی، وکتورهای اپیزومی غیر یکپارچه DNA کوچک دایره ای وحذف حامل های یکپارچه با استفاده از انتقال piggyback یا loxP/Cre-recombinase ویروسی قابل برداشت می باشد. سیستم غیر وکتوری شامل mRNA های اصلاح شده مصنوعی و چهار عامل مبتنی بر پروتئین نوترکیب برای تولید iPSC ها در سیستم موشی و انسانی می باشد. برنامه ریزی مجدد iPSC بر پایه پروتئین های نوترکیب موشی منجر به یکپارچگی ژنومیک بیشتر در مقایسه با استراتژی های ناشی از ویروس می شود. پروتکل ۱،۱ جزئیات روش استفاده از loxP/

نیاز به بررسی دارد. بازسازی بافت عصبی یک چالش بزرگ در رشته پزشکی بازساختی می باشد. از آنجایی که بافت های عصبی ظرفیت ترمیم کنندگی پایینی دارند و اختلالات عصبی شرایط پزشکی بسیار دشوار را برای بیماران ایجاد می کند. پیشرفت قابل توجهی در تمایز سلول های عصبی خاص از hESC/iPSC ها، همانطور که به برخی از آن ها در این فصل به آنها اشاره شد صورت گرفته است. به علاوه تحقیقات بیشتر برای روشن شدن رویدادهای مولکولی که در طول برنامه ریزی مجدد اتفاق می افتد، بهبود ایمنی و کارایی پروتکل های کشت و همچنین برای تعریف تمایز پیشرفته، مراحل تولید سلول های ایمن، موثر و کاربردی دودمان های خاص برای سلول درمانی مورد نیاز است.

با این حال، hiPSC ها، چنین حافظه ای را تا قسمت ۶۵ حفظ می کنند. ممکن است از این حافظه اپی ژنتیک برای اهداف بالینی خاص مورد نیاز است که ممکن است از iPSC ها مشتق شده باشد. مثلا، ممکن است از iPSC های مشتق شده از لیمبال انسانی برای ایجاد اپیتلیوم لیمبال و از iPSC ها حاصل از فیبروبلاست برای کاربردهای پزشکی استفاده شود. همچنین کارایی تمایز iPSC های مشتق از سلول های پیش ساز قلبی نیز به قلب در مقایسه با iPSC های مشتق از فیبروبلاست در تمایز بیشتر است. به همین ترتیب، iPSC های سلول های دندان را می توان از ساقه دندان برای بازسازی بافت دندان به دست آورد.

توسعه یک کتابخانه iPSC

تولید iPSC های منفرد تحت دستورالعمل های عمل (GMP) پرهزینه است، اما بانکی از رده های سلولی آلوژنیک در بالین برای غلبه بر این موضوع توسط GMP پیشنهاد شده است. یک هاپلوبانک شامل ۱۰۰ خط iPSC با بیشترین HLA مکرر در هر جمعیت با ۷۸ درصد مطابقت جمعیت آمریکایی های اروپایی، ۶۳ درصد از آمریکایی های آسیایی، ۵۲ درصد از آمریکایی های اسپانیایی تبار و ۴۵ درصد از آمریکایی های آفریقایی تبار می باشد. (Gourraud et al., ۲۰۱۲; Turner et al., ۲۰۱۳). برای بدست آوردن چنین هاپلوبانکی از iPSC ها، نیاز به مقیاس بزرگی از همکاری هماهنگ در سراسر جهان می باشد.

نتیجه گیری و چشم اندازها

فناوری iPSC به ما این امکان را می دهد که پلاستیسیته سلول ها در طول مسیرهای تمایز و تمایز زدایی بیشتر درک کنیم. همچنین بازسازی اپی ژنتیک در طول وضعیت نابالغ سلول های بنیادی و تمایز آن ها مهمتر از همه، کاربردهای پزشکی که یکی از آنها درمان مبتنی بر سلول است توجه زیادی را به خود جلب نموده است. خطوط iPSC سفارشی شده را می توان از هر فردی برای استفاده اتولوگ و همچنین آلوژنیک ایجاد کرد و دودمان سلولی که از هر سه لایه زیا جنینی منشا می گیرند می تواند جایگزین استفاده از ESC ها شود. در حالی که درک وضعیت مولکولی iPSC ها در ژنتیک و بررسی سطوح اپی ژنتیک از جمله ایمنی هنوز ناقص است این سلول ها برای کاربردهای کلینیکی و ظرفیت های درمانی

References

- AASEN, T., RAYA, A., BARRERO, M. J., GARRETA, E., CONSIGLIO, A., GONZALEZ, F., et al. 2008. Efficient and rapid generation of induced pluripotent stem cells from human keratinocytes. *Nat Biotech*, 26, 1276–1284.
- AGARWAL, S., LOH, Y. H., MCLOUGHLIN, E. M., HUANG, J., PARK, I. H., MILLER, J. D., et al. 2010. Telomere elongation in induced pluripotent stem cells from dyskeratosis congenita patients. *Nature*, 464, 292–296.
- ARAKAKI, M., ISHIKAWA, M., NAKAMURA, T., IWAMOTO, T., YAMADA, A., FUKUMOTO, E., et al. 2012. Role of epithelial-stem cell interactions during dental cell differentiation. *J Biol Chem*, 287, 10590–10601.
- ARDESHIRYLAJIMI, A., HOSSEINKHANI, S., PARIVAR, K., YAGHMAIE, P., & SOLEIMANI, M. 2013. Nanofiber-based polyethersulfone scaffold and efficient differentiation of human induced pluripotent stem cells into osteoblastic lineage. *Mol Biol Rep*, 40, 4287–4294.
- BAN, H., NISHISHITA, N., FUSAKI, N., TABATA, T., SAEKI, K., SHIKAMURA, M., et al. 2011. Efficient generation of transgene-free human induced pluripotent stem cells (iPSCs) by temperature-sensitive Sendai virus vectors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108, 14234–14239.

- BOLAND, M. J., HAZEN, J. L., NAZOR, K. L., RODRIGUEZ, A. R., GIFFORD, W., MARTIN, G., et al. 2009. Adult mice generated from induced pluripotent stem cells. *Nature*, 461, 91–94.
- CAI, J., YANG, M., POREMSKY, E., KIDD, S., SCHNEIDER, J. S., & IACOVITTI, L. 2010. Dopaminergic neurons derived from human induced pluripotent stem cells survive and integrate into 6-OHDA lesioned rats. *Stem Cells and Develop*, 9, 1017–1023.
- CAI, J., ZHANG, Y., LIU, P., CHEN, S., WU, X., SUN, Y., et al. 2013. Generation of tooth-like structures from integration-free human urine induced pluripotent stem cells. *Cell Regen*, 2, 6.
- CARETTE, J.E., PRUSZAK, J., VARADARAJAN, M., BLOMEN, V. A., GOKHALE, S., CAMARGO, F. D., et al. 2010. Generation of iPSCs from cultured human malignant cells. *Blood*, 115, 4039–4042.
- CHAMBERS, S. M., FASANO, C. A., PAPAPETROU, E. P., TOMISHIMA, M., SADELAIN, M., & STUDER, L. 2009. Highly efficient neural conversion of human ES and iPS cells by dual inhibition of SMAD signaling. *Nat Biotechnol*, 27, 275–280.
- CHEN, Y., CARTER, R. L., CHO, I. K., & CHAN, A. W. 2014. Cell-based therapies for Huntington's disease. *Drug Discov Today*, 19, 980–984.
- CHEUNG, A. Y., HORVATH, L. M., CARREL, L. & ELLIS, J. 2012. X-chromosome inactivation in Rett syndrome human induced pluripotent stem cells. *Fronts Psychiatry*, 3, 24.
- CHOI, K. D., YU, J., SMUGA-OTTO, K., SALVAGIOTTO, G., REHRAUER, W., VODYANIK, M., et al. 2009. Hematopoietic and endothelial differentiation of human induced pluripotent stem cells. *Stem Cells*, 27, 559–567.
- COWAN, C. A., ATIENZA, J., MELTON, D. A. & EGGAN, K. 2005. Nuclear reprogramming of somatic cells after fusion with human embryonic stem cells. *Science*, 309, 1369–1373.
- CYRANOSKI, D. 2013. Stem cells cruise to clinic. *Nature*, 494, 413.
- DIEKMAN, B. O., CHRISTOFOROU, N., WILLARD, V. P., SUN, H., SANCHEZ-ADAMS, J., LEONG, K. W., et al. 2012. Cartilage tissue engineering using differentiated and purified induced pluripotent stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109, 19172–19177.
- DIMOS, J. T., RODOLFA, K. T., NIAKAN, K. K., WEISENTHAL, L. M., MITSUMOTO, H., CHUNG, W., et al. 2008. Induced pluripotent stem cells generated from patients with ALS can be differentiated into motor neurons. *Science*, 321, 1218–1221.
- DUAN, X., TU, Q., ZHANG, J., YE, J., SOMMER, C., MOSTOSLAVSKY, G., et al. 2011. Application of induced pluripotent stem (iPS) cells in periodontal tissue regeneration. *J Cell Physiol*, 226, 150–157.
- DURRUTHY-DURRUTHY, J., BRIGGS, S. F., AWE, J., RAMATHAL, C. Y., KARUMBAYARAM, S., LEE, P. C., et al. 2014. Rapid and efficient conversion of integration-free human induced pluripotent stem cells to GMP-grade culture conditions. *PLoS One*, 9, e94231.
- EFTHYMIOU, A. G., CHEN, G., RAO, M., CHEN, G., & BOEHM, M. 2014. Self-renewal and cell lineage differentiation strategies in human embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells. *Expert Opin Biol Ther*, 14, 1333–1344.
- FENG, Q., LU, S. J., KLIMANSKAYA, I., GOMES, I., KIM, D., CHUNG, Y., et al. 2010. Hemangioblastic derivatives from human induced pluripotent stem cells exhibit limited expansion and early senescence. *Stem Cells*, 28, 704–712.
- GALLICANO, G. I., & MISHRA, L. 2010. Hepatocytes from induced pluripotent stem cells: A giant leap forward for hepatology. *Hepatology*, 51, 20–22.
- GERMANGUZ, I., SEDAN, O., ZEEVI-LEVIN, N., SHTRICHMAN, R., BARAK, E., ZISKIND, A., et al. 2011. Molecular characterization and functional properties of cardiomyocytes derived from human inducible pluripotent stem cells. *J Cell Mol Med*, 15, 38–51.
- GHOSH, Z., WILSON, K. D., WU, Y., HU, S., QUERTERMOUS, T., & WU, J. C. 2010. Persistent donor cell gene expression among human induced pluripotent stem cells contributes to differences with human embryonic stem cells. *PLoSOne*, 5, e8975.
- GIORGETTI, A., MONTSERRAT, N., AASEN, T., GONZALEZ, F., RODRÍGUEZ-PIZÀ, I., VASSENA, R., et al. 2009. Generation of induced pluripotent stem cells from human cord blood using OCT4 and SOX2. *Cell Stem Cell*, 5, 353–357.
- GIORGETTI, A., MONTSERRAT, N., RODRÍGUEZ-PIZÀ, I., AZQUETA, C., VEIGA, A., & BELMONTE, J. C. I. 2010. Generation of induced pluripotent stem cells from human cord blood cells with only two factors: OCT4 and SOX2. *Nat Protocols*, 5, 811–820.
- GÓMEZ, M. C., POPE, C. E., & DRESSER, B. L. 2006. Nuclear transfer in cats and its application. *Theriogenology*, 66, 72–81.
- GONZALEZ, F., BARRAGAN MONASTERIO, M., TISCORNIA, G., MONTSERRAT PULIDO, N., VASSENA, R., BATLLE MORERA, L., et al. 2009. Generation of mouse-induced pluripotent stem cells by transient expression of a single non-viral polycistronic vector. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106, 8918–8922.
- GORE, A., LI, Z., FUNG, H. L., YOUNG, J. E., AGARWAL, S., ANTOSIEWICZ-BOURGET, J., et al. 2011. Somatic coding mutations in human induced pluripotent stem cells. *Nature*, 471, 63–67.
- GOURRAUD, P. A., GILSON, L., GIRARD, M., & PESCHANSKI, M. 2012. The role of human leukocyte antigen matching in the development of multiethnic “haplobank” of induced pluripotent stem cell lines. *Stem Cells*, 30, 180–186.
- HANNA, J., WERNIG, M., MARKOULAKI, S., SUN, C.-W., MEISSNER, A., CASSADY, J. P., et al. 2007. Treatment of sickle cell anemia mouse model with iPS cells generated from autologous skin. *Science*, 318, 1920–1923.
- HIRSCHI, K. K., LI, S., & ROY, K. (2014). Induced pluripotent stem cells for regenerative medicine. *Ann Rev Biomed Eng*, 16, 277–294.

- HU, B. Y., WEICK, J. P., YU, J., MA, L. X., ZHANG, X. Q., THOMSON, J. A., et al. 2010. Neural differentiation of human induced pluripotent stem cells follows developmental principles but with variable potency. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107, 4335–4340.
- HUANG, G. T., GRONTHOS, S., & SHI, S. 2009. Mesenchymal stem cells derived from dental tissues vs. those from other sources: Their biology and role in regenerative medicine. *J Dent Res*, 88, 792–806.
- ISRAEL, M. A., YUAN, S. H., BARDY, C., REYNA, S. M., MU, Y., HERRERA, C., et al. 2012. Probing sporadic and familial Alzheimer's disease using induced pluripotent stem cells. *Nature*, 482, 216–220.
- JIA, F., WILSON, K. D., SUN, N., GUPTA, D. M., HUANG, M., LI, Z., et al. 2010. A nonviral minicircle vector for deriving human iPS cells. *Nature Methods*, 7, 197–199.
- JIANG, G., DI BERNARDO, J., DELONG, C. J., MONTEIRO DA ROCHA, A., O'SHEA, K. S., & KUNISAKI, S. M. 2014. Induced pluripotent stem cells from human placental chorion for perinatal tissue engineering applications. *Tissue Engineering Part C, Methods*, 20, 731–734.
- JIN, G. Z., KIM, T. H., KIM, J. H., WON, J. E., YOO, S. Y., CHOI, S. J., et al. 2013. Bone tissue engineering of induced pluripotent stem cells cultured with macrochanneled polymer scaffold. *J Biomed Mats Res Part A*, 101, 1283–1291.
- KAJI, K., NORRBY, K., PACA, A., MILEIKOVSKY, M., MOHSENI, P., & WOLTJEN, K. 2009. Virus-free induction of pluripotency and subsequent excision of reprogramming factors. *Nature*, 458, 771–775.
- KANG, L., WANG, J., ZHANG, Y., KOU, Z., & GAO, S. 2009. iPS cells can support full-term development of tetraploid blastocyst-complemented embryos. *Cell Stem Cell*, 5, 135–138.
- KARUMBAYARAM, S., NOVITCH, B. G., PATTERSON, M., UMBACH, J. A., RICHTER, L., LINDGREN, A., et al. 2009. Directed differentiation of human-induced pluripotent stem cells generates active motor neurons. *Stem Cells*, 27, 806–811.
- KAWAMURA, M., MIYAGAWA, S., MIKI, K., SAITO, A., FUKUSHIMA, S., HIGUCHI, T., et al. 2012. Feasibility, safety, and therapeutic efficacy of human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocyte sheets in a porcine ischemic cardiomyopathy model. *Circulation*, 126, S29–S37.
- KIM, D., KIM, C.-H., MOON, J.-I., CHUNG, Y.-G., CHANG, M.-Y., HAN, B.-S., et al. 2009. Generation of human induced pluripotent stem cells by direct delivery of reprogramming proteins. *Cell Stem Cell*, 4, 472–476.
- KIM, D. S., ROSS, P. J., ZASLAVSKY, K., & ELLIS, J. 2014. Optimizing neuronal differentiation from induced pluripotent stem cells to model ASD. *Front Cell Neurosci*, 8, 109.
- KIM, J., LEE, Y., KIM, H., HWANG, K. J., KWON, H. C., KIM, S. K., et al. 2007. Human amniotic fluid-derived stem cells have characteristics of multipotent stem cells. *Cell Prolif*, 40, 75–90.
- KIM, K., DOI, A., WEN, B., NG, K., ZHAO, R., CAHAN, P., et al. 2010. Epigenetic memory in induced pluripotent stem cells. *Nature*, 467, 285–290.
- KOBAYASHI, Y., OKADA, Y., ITAKURA, G., IWAI, H., NISHIMURA, S., YASUDA, A., et al. 2012. Pre-evaluated safe human iPSC-derived neural stem cells promote functional recovery after spinal cord injury in common marmoset without tumorigenicity. *PLoS One* 7, e52787.
- KOLF, C., CHO, E., & TUAN, R. (2007). Mesenchymal stromal cells. Biology of adult mesenchymal stem cells: Regulation of niche, self-renewal and differentiation. *Arthritis Res Ther*, 9, 204.
- KOYAMA, N., MIURA, M., NAKAO, K., KONDO, E., FUJII, T., TAURA, D. et al. 2013. Human induced pluripotent stem cells differentiated into chondrogenic lineage via generation of mesenchymal progenitor cells. *Stem Cells and Devel*, 22, 102–113.
- KWON, Y. W., CHUNG, Y. J., KIM, J., LEE, H. J., PARK, J., ROH, T. Y. et al. 2014. Comparative study of efficacy of dopaminergic neuron differentiation between embryonic stem cell and protein-based induced pluripotent stem cell. *PLoS One*, 9, e85736.
- LEE, G., KIM, H., ELKABETZ, Y., AL SHAMY, G., PANAGIOTAKOS, G., BARBERI, T., et al. 2007. Isolation and directed differentiation of neural crest stem cells derived from human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol*, 25, 1468–1475.
- LENGNER, C. J. (2010). iPS cell technology in regenerative medicine. *Ann N Y Acad Sci*, 1192, 38–44.
- LI, C., ZHOU, J., SHI, G., MA, Y., YANG, Y., GU, J., et al. 2009. Pluripotency can be rapidly and efficiently induced in human amniotic fluid-derived cells. *Hum Mol Genet*, 18, 4340–4349.
- LIN, F. K., & CHUI, Y. L. 2012. Generation of induced pluripotent stem cells from mouse cancer cells. *Cancer Biother Radiopharm*, 27, 694–700.
- LISTER, R., PELIZZOLA, M., KIDA, Y. S., HAWKINS, R. D., NERY, J. R., HON, G., et al. 2011. Hotspots of aberrant epigenomic reprogramming in human induced pluripotent stem cells. *Nature*, 471, 68–73.
- LIU, G. H., BARKHO, B. Z., RUIZ, S., DIEP, D., QU, J., YANG, S. L., et al. 2011. Recapitulation of premature ageing with iPSCs from Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Nature*, 472, 221–225.
- LIU, P., ZHANG, Y., CHEN, S., CAI, J., & PEI, D. 2014. Application of iPS cells in dental bioengineering and beyond. *Stem Cell Reviews*, 10, 663–670.
- LOH, Y. H., AGARWAL, S., PARK, I. H., URBACH, A., HUO, H., HEFFNER, G. C., et al. 2009. Generation of induced pluripotent stem cells from human blood. *Blood*, 113, 5476–5479.
- MARIANI, J., SIMONINI, M. V., PALEJEV, D., TOMASINI, L., COPPOLA, G., SZEKELY, A. M., et al. 2012a. Modeling human cortical development in vitro using induced pluripotent stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109, 12770–12775.
- MARIANI, J., SIMONINI, M. V., PALEJEV, D., TOMASINI, L., COPPOLA, G., SZEKELY, A. M., et al. 2012b. Modeling human cortical development in vitro using induced pluripotent stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109, 12770–12775.
- MASON, S., TARLE, S. A., OSIBIN, W., KINFU, Y., & KAIGLER, D. 2014. Standardization and safety of alveolar bone-derived stem cell isolation. *J Dent Res*, 93, 55–61.

- MIYASHITA, N., SHIGA, K., YONAI, M., KANEYAMA, K., KOBAYASHI, S., KOJIMA, T., et al. 2002. Remarkable differences in telomere lengths among cloned cattle derived from different cell types. *Biol Reprod*, 66, 1649–1655.
- MIYOSHI, K., TSUJI, D., KUDOH, K., SATOMURA, K., MUTO, T., ITOH, K., et al. 2010a. Generation of human induced pluripotent stem cells from oral mucosa. *J Biosci Bioeng*, 110, 345–350.
- MIYOSHI, N., ISHII, H., NAGAI, K., HOSHINO, H., MIMORI, K., TANAKA, F., et al. 2010b. Defined factors induce reprogramming of gastrointestinal cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107, 40–45.
- MIZUNO, Y., CHANG, H., UMEDA, K., NIWA, A., IWASA, T., AWAYA, T., et al. 2010. Generation of skeletal muscle stem/progenitor cells from murine induced pluripotent stem cells. *FASEB J*, 24, 2245–2253.
- MOHAMAD, O., DRURY-STEWART, D., SONG, M., FAULKNER, B., CHEN, D., YU, S. P., et al. 2013a. Vector-free and transgene-free human iPS cells differentiate into functional neurons and enhance functional recovery after ischemic stroke in mice. *PLoS One* 8, e64160.
- MOHAMAD, O., YU, S. P., CHEN, D., OGLE, M., SONG, M., & WIE, L. 2013b. Efficient neuronal differentiation of mouse ES and iPS cells using a rotary cell culture protocol. *Differentiation*, 86, 149–158.
- MORIZANE, A., DOI, D., KIKUCHI, T., NISHIMURA, K., & TAKAHASHI, J. 2011. Small-molecule inhibitors of bone morphogenic protein and activin/nodal signals promote highly efficient neural induction from human pluripotent stem cells. *J Neurosci Res*, 89, 117–126.
- MORSCZECK, C., HUANG, G. T.-J., & SHI, S. 2013. Stem and progenitor cells of dental and gingival tissue origin. In *Stem Cells in Craniofacial Development and Regeneration*, Eds. G. T. J. Huang & I. Thesleff. Hoboken, NJ: Wiley-Blackwell, p. 285.
- NAKAGAWA, M., KOYANAGI, M., TANABE, K., TAKAHASHI, K., ICHISAKA, T., AOI, T., et al. 2008. Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts. *Nat Biotech*, 26, 101–106.
- NISHIKAWA, S.-I., GOLDSTEIN, R. A., & NIERRAS, C. R. 2008. The promise of human induced pluripotent stem cells for research and therapy. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 9, 725–729.
- NOGGLE, S., FUNG, H.-L., GORE, A., MARTINEZ, H., SATTRIANI, K. C., PROSSER, R., et al. 2011. Human oocytes reprogram somatic cells to a pluripotent state. *Nature*, 478, 70–75.
- OH, H. J., HONG, S. G., PARK, J. E., KANG, J. T., KIM, M. J., KIM, M. K., et al. (2009). Improved efficiency of canine nucleus transfer using roscovitine-treated canine fibroblasts. *Theriogenology*, 72, 461–470.
- OKITA, K., MATSUMURA, Y., SATO, Y., OKADA, A., MORIZANE, A., OKAMOTO, S., et al. 2011. A more efficient method to generate integration-free human iPS cells. *Nat Methods*, 8, 409–412.
- OKITA, K., NAKAGAWA, M., HYENJONG, H., ICHISAKA, T., & YAMANAKA, S. 2008. Generation of mouse induced pluripotent stem cells without viral vectors. *Science*, 322, 949–953.
- OTSU, K., KISHIGAMI, R., OIKAWA-SASAKI, A., FUKUMOTO, S., YAMADA, A., FUJIWARA, N., et al. 2012. Differentiation of induced pluripotent stem cells into dental mesenchymal cells. *Stem Cells and Devel*, 21, 1156–1164.
- OTSU, K., KUMAKAMI-SAKANO, M., FUJIWARA, N., KIKUCHI, K., KELLER, L., LESOT, H., et al. 2014. Stem cell sources for tooth regeneration: Current status and future prospects. *Front Physiol*, 5, 36.
- PARK, H., KIM, D., KIM, C. H., MILLS, R. E., CHANG, M. Y., ISKOW, R. C., et al. 2014. Increased genomic integrity of an improved protein-based mouse induced pluripotent stem cell method compared with current viral-induced strategies. *Stem Cells Translat Med*, 3, 599–609.
- PARK, I. H., ARORA, N., HUO, H., MAHERALI, N., AHFELDT, T., SHIMAMURA, A., et al. 2008a. Disease-specific induced pluripotent stem cells. *Cell*, 134, 877–886.
- PARK, I. H., ZHAO, R., WEST, J. A., YABUUCHI, A., HUO, H., INCE, T. A., et al. 2008b. Reprogramming of human somatic cells to pluripotency with defined factors. *Nature*, 451, 141–146.
- PARK, S., & IM, G. I. 2013. Embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells for skeletal regeneration. *Tissue Eng Part B Rev*, 20, 381–391.
- PETERSON, S. E., & LORING, J. F. 2014. Genomic instability in pluripotent stem cells: Implications for clinical applications. *J Biol Chem*, 289, 4578–4584.
- POLO, J. M., LIU, S., FIGUEROA, M. E., KULALERT, W., EMINLI, S., TAN, K. Y. et al. 2010. Cell type of origin influences the molecular and functional properties of mouse induced pluripotent stem cells. *Nat Biotechnol*, 28, 848–855.
- RAO, M. S., & MALIK, N. 2012. Assessing iPSC reprogramming methods for their suitability in translational medicine. *J Cell Biochem*, 113, 3061–3068.
- RAYA, A., RODRIGUEZ-PIZA, I., GUENECHEA, G., VASSENENA, R., NAVARRO, S., BARRERO, M. J., et al. 2009. Disease-corrected haematopoietic progenitors from Fanconi anaemia induced pluripotent stem cells. *Nature*, 460, 53–59.
- REVAZOVA, E. S., TUROVETS, N. A., KOCHETKOVA, O. D., KINDAROVA, L. B., KUZMICHEV, L. N., JANUS, J. D., et al. 2007. Patient-specific stem cell lines derived from human parthenogenetic blastocysts. *Cloning and Stem Cells*, 9, 432–449.
- REVAZOVA, E. S., TUROVETS, N. A., KOCHETKOVA, O. D., AGAPOVA, L. S., SEBASTIAN, J. L., PRYZHKOVA, M. V., et al. 2008. HLA homozygous stem cell lines derived from human parthenogenetic blastocysts. *Cloning and Stem Cells*, 10, 11–24.
- SANCHEZ-FREIRE, V., LEE, A. S., HU, S., ABILEZ, O. J., LIANG, P., LAN, F., et al. 2014. Effect of human donor cell source on differentiation and function of cardiac induced pluripotent stem cells. *J Am Coll Cardiol*, 64, 436–448.
- SAREEN, D., SAGHIZADEH, M., ORNELAS, L., WINKLER, M. A., NARWANI, K., SAHABIAN, A., et al. 2014. Differentiation of human limbal-derived induced pluripotent stem cells into limbal-like epithelium. *Stem Cells Translat Med*, 3, 1002–1012.