مجله دانشکده پزشکی اصفهان
سال سی و چهارم/شماره‌ی ۳۸۳/هفته‌ی سوم تیر ماه ۱۳۹۵

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۱/۲۸
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۳/۵

اهمیت بررسی ناپایداری‌های ژنومی در درمان‌های مبتنی بر سلول‌های بنیادی

اکرم علیزاده[۱]، **ثریا قاسمی**[۱]

مقاله مروری

چکیده

سلول‌های بنیادی، جزء اصلی درمان‌های مبتنی بر سلول و پزشکی بازساختی، جهت جایگزینی بافت‌ها و اعضای آسیب دیده و درمان بیماری‌های مختلف هستند. تکثیر و تمایز سلول‌های بنیادی، جهت استفاده در پزشکی بازساختی، مستلزم کشت این سلول‌ها به صورت In vitro است. هر چند تا کنون خطرزا بودن استفاده از این سلول‌ها اثبات نشده است، اما علاوه بر احتمال وجود سلول‌های تمایز نیافته و تمایز خودبه‌خودی آن‌ها پس از پیوند و ایجاد تراتوما، ژنوم این سلول‌ها در محیط‌های کشت، بی‌ثبات است و تغییر می‌کند. ناپایداری ژنومی، می‌تواند ایمنی پیوند این سلول‌ها یا بافت‌های حاصل از آن‌ها را با چالش روبه‌رو کند. ناپایداری ژنومی، از ویژگی‌های مشترک سلول‌های سرطانی و بنیادی است. از این رو، این نگرانی وجود دارد که ناپایداری ژنومی در سلول‌های بنیادی، تومورزا باشد. ناپایداری‌های ژنومی، در اندازه‌های مختلف از جهش نقطه‌ای تا آنیوپلوئیدی و موزاییسم را شامل می‌شود. نوع سلول بنیادی، برخی شرایط محیط کشت و نحوه‌ی دست‌ورزی سلول‌ها، از جمله زمان طولانی کشت، در ایجاد و فراوانی این ناپایداری‌ها مؤثر است. از این رو، توصیه می‌شود ضمن بهینه نمودن زمان و شرایط کشت، قبل از استفاده‌های درمانی، وجود احتمالی تغییرات ژنومی با روش‌های آشکارسازی مناسب، بررسی و پی‌گیری شود.

واژگان کلیدی: ناپایداری ژنومی، سلول‌های بنیادی، درمان‌های مبتنی بر سلول

ارجاع: علیزاده اکرم، قاسمی ثریا. **اهمیت بررسی ناپایداری‌های ژنومی در درمان‌های مبتنی بر سلول‌های بنیادی.** مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۵؛ ۳۴ (۳۸۳): ۵۷۲-۵۷۹

مقدمه

سلول‌های بنیادی (Stem cells یا SCs)، سلول‌هایی با قابلیت تبدیل به انواع دیگر سلول‌ها هستند که با توجه به منشأ خود به دو دسته‌ی کلی سلول‌های بنیادی جنینی (hESCs یا Human embryonic stem cells) و سلول‌های بنیادی بالغ یا مزانشیمی (MSCs یا Mesenchymal stem cells) تقسیم می‌شوند. به علت محدودیت‌های اخلاقی موجود در دستیابی به سلول‌های بنیادی جنینی، مهم‌ترین سلول‌های بنیادی مورد استفاده، انواع سلول‌های بنیادی بالغ هستند (۲-۱).

سلول‌های بنیادی جنینی، اغلب قابلیت تمایز به همه‌ی انواع سلول‌های تمایز یافته را دارند و پرتوان نامیده می‌شوند؛ حال آن که سلول‌های بنیادی بالغ، توانایی تمایز به انواع محدودتری از سلول‌های تمایز یافته را دارند و چند توان نام دارند. سلول‌های بنیادی پرتوان القایی (iPSCs یا Induced pluripotent stem cells) نیز دسته‌ای از SCs هستند که از سلول‌های بالغ مشتق می‌شوند و امروزه، در پزشکی بازساختی مورد استفاده قرار می‌گیرند (۳). از سال‌ها پیش، استفاده از سلول‌های بنیادی در درمان‌های مبتنی بر سلول و پزشکی بازساختی، جهت جایگزینی بافت‌های آسیب دیده و درمان بیماری‌های خونی و قلبی- عروقی، اسکلتی- ماهیچه‌ای، ضایعات عصبی و نورودژنراتیو (۴، ۲)، دیابت، جراحت‌ها، آسیب‌های ستون فقرات و کبد، به عنوان گزینه‌ی درمانی مؤثری مد نظر قرار گرفته است (۶-۵). سلول‌های بنیادی مزانشیمی، در بسیاری از بافت‌ها شامل مغز استخوان، بافت چربی، خون بند ناف، خون محیطی و پالپ دندان وجود دارند و از قابلیت جدا شدن برخوردارند. به علت سهولت دسترسی، این نوع سلول‌های بنیادی، پرکاربردترین سلول‌ها در پزشکی بازساختی هستند (۷-۱). تعداد MSCs در بافت‌های انسانی بسیار کم است؛ از طرفی، تعداد این سلول‌ها با افزایش سن کاهش می‌یابد. از این رو، استفاده از این سلول‌ها در پزشکی بازساختی، مستلزم تکثیر این سلول‌ها در خارج بدن یا In vitro است (۸).

۱- استادیار، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، شهرکرد، ایران
نویسنده‌ی مسؤول: ثریا قاسمی
Email: s.ghasemi@skums.ac.ir

خوشبختانه، این سلول‌ها می‌توانند در بلند مدت در محیط‌های کشت تکثیر شوند و به میزان کافی جهت پیوند و یا سایر کاربردهای درمانی نظیر مهندسی بافت، تهیه شوند. حضور این سلول‌ها به مدت طولانی در محیط‌های کشت سنتتیک، مورفولوژی این سلول‌ها را تحت تأثیر و تغییر قرار می‌دهد (۹، ۲-۱). در واقع، SCs نسبت به مقادیر بسیار اندک انواع مختلف مواد موجود در محیط خود حساس هستند و به راحتی می‌توان با استفاده از برخی مواد، تمایز این سلول‌ها را به سمت خاصی سوق داد (۱).

جدیدترین مطالعات نشان داده‌اند که نه تنها مورفولوژی SCs بلکه ژنوم در این سلول‌ها در محیط‌های کشت در طی تکثیر و تمایز، بی‌ثبات است و تغییر می‌کند. بی‌ثباتی ژنوم ایمنی پیوند این سلول‌ها یا بافت‌های حاصل از آن‌ها را با چالش روبه‌رو می‌کند (۱۲-۱۰). فشارهای انتخابی در محیط‌های کشت، می‌توانند منجر به تغییر جهت‌دار جمعیت سلول‌ها گردند. از این رو، برخی مضاعف شدگی یا حذف‌ها در ژنوم، برای سلول فوایدی را در پی دارند و بنا بر این، به صورت غالب خود را نشان می‌دهند. ناپایداری ژنومیک در این سلول‌ها، اولین بار در سال ۲۰۰۰ تشخیص داده شد (۹). از آن زمان، بسیاری از ناهنجاری‌های ژنومیک در این سلول‌ها مشخص شده‌اند. به طور تقریبی، تمام انواع SCs، این ویژگی را نشان می‌دهند، اما نوع تغییرات، مختص نوع سلول است (۱۲).

محققین، شباهت‌های مشترک بسیاری را بین سلول‌های سرطانی و بنیادی از جمله ناپایداری ژنوم یافته‌اند (۱۳). هر چند شواهد اندکی از تومورزا بودن ناپایداری ژنوم In vitro در SCs وجود دارد(۱۴)، اما برای استفاده‌های بالینی سلول‌هایی با منشأ SCs، دو نگرانی مهم وجود دارد: اول این که سلول‌های پیوند شده، پس از تمایز هنوز شامل سلول‌های تمایز نیافته‌ای هستند که می‌توانند عامل ایجاد سلول‌های خوش‌خیم تراتوما شوند. به عبارت دیگر، پس از انتقال سلول‌ها به بدن، تراتوماها می‌توانند از زیر جمعیتی از سلول‌ها که تمایز پیدا نکرده‌اند، شکل بگیرند. از طرفی، ممکن است تکثیر سلول‌هایی که به طور کامل تمایز نیافته‌اند، عامل ایجاد تومورها باشد. این تومورها، به طور کلی خوش‌خیم هستند، اما می‌توانند به صورت بالقوه خطرناک باشند. از سوی دیگر، وقتی سلول‌های طبیعی از نظر ژنتیک پیوند زده می‌شوند، بعد از پیوند، این امکان وجود دارد که خود به خود دچار تغییر شوند (۱۵-۱۴). به دلیل آن که ناپایداری ژنتیک به طور بالقوه می‌تواند عامل ایجاد تومورها گردد، اگر سلول‌های غیر طبیعی از نظر ژنومیک، قبل از پیوند تشخیص داده نشوند، با احتمال بیشتری منجر به ایجاد تومور می‌گردند (۱۶-۱۴). شاهد این ادعا، مشابه الگوی بیانی ژن‌ها در hESCs است که در برخی تومورهای انسانی مهاجم نیز یافت شده است (۱۷).

مطالعات اندکی در زمینه‌ی نقش مستقیم این انحرافات ژنومیک در ایجاد تومور، وجود دارد (۱۴)؛ اما هر چند، سلول‌درمانی با مبنای SCs ممکن است به طور ذاتی آسیب‌زا نباشد، اما بدون کنترل تغییرات ژنومی حادث شده در محیط کشت، می‌تواند عواقب عظیمی داشته باشد (۱۸، ۱۴). بنا بر این، ثبات ژنتیک تا حد امکان باید حفظ شود؛ چرا که به هم ریختگی ژنومی به بافت‌هایی که از آن مشتق می‌شوند، به ارث می‌رسند.

متداول‌ترین ناهنجاری‌های ژنومی شناخته شده در hESCs

مطالعات نشان می‌دهد، در این سلول‌ها نیز برخی ناهنجاری‌های ژنومی به کرات اتفاق می‌افتند. هر چند، گاهی نیز با گذشت زمان‌های طولانی کشت، کاریوتایپ hESCs ثابت باقی می‌ماند. به دلیل سرعت تقسیم بالا و ویژگی‌های منحصر به فرد چرخه‌ی سلولی، این سلول‌ها مستعد بی‌ثباتی ژنومیک هستند. به علاوه، شباهت‌های دیگری نیز بین سلول‌های بنیادی چند توان و سرطانی شناخته شده است (۱۹). در تجربه‌ای از تمایز به سمت سلول‌های قلبی، مشاهده شد که پس از ۵ روز، سلول‌های تمایز یافته برای کروموزوم ۲۰ دچار مضاعف شدگی شدند. سلول‌های انسانی پرتوان، در حین تمایز به سلول‌های نورونی، توانایی خود را برای سنه سنس از دست می‌دهند. این فقدان با Amplification منطقه‌ای از کروموزوم 1q مرتبط است (۲۰). از طرفی، در برخی انواع این سلول‌ها، تعدادی از تنوع‌های تعداد کپی Copy number variations (CNVs) در قسمت‌هایی از کروموزوم‌های مختلف گزارش شده است (۲۲-۲۱، ۳).

این مناطق، حاوی برخی ژن‌های کد کننده‌ی پروتئین و micro-RNAs (miRs) ویژه‌ای هستند. برای مثال، CNV ژن BCL2L1 با عملکرد افزایش زنده ماندن و نیز miR-1825 که از جمله اهداف آن، ژن‌های متوقف کننده‌ی رشد و افزایش دهنده‌ی آپوپتوز هستند، گزارش شده است (۲۳). از طرفی، در سلول‌های چند توان انسانی و نیز کارسینوماهای جنینی، کسب کروموزوم‌های ۱، ۱۲، ۱۷ و X مشاهده می‌شود (۲۴). برخی از این تغییرات در بین SCs و سلول‌های سرطانی مشابه است. برای مثال، Amplification بازوی بلند کروموزوم ۲۰ در برخی سلول‌های سرطانی و SCs، اتفاق می‌افتد (۲۵).

برخی مطالعات در زمینه‌ی سرطان‌ها نیز نشان می‌دهند که ناهنجاری‌های کروموزومی، می‌تواند عامل ایجاد تومور و بدخیمی‌ها باشد (۲۶، ۱۴). همچنین، برخی ویژگی‌های سلول‌های سرطانی و بنیادی نظیر طول عمر، مقاومت نسبی به آپوپتوز و توانایی تکثیر در زمان‌های طولانی مشابه هستند. به علاوه، تنظیم کنندگان رشد و مکانیسم‌های کنترلی مشابهی در هر دوی این سلول‌ها وجود دارند. بنا

بر این، بعید به نظر نمی‌رسد که SCs هم بتوانند دستخوش تغییرات بدخیمی شوند که اغلب به عنوان یک مانع برای استفاده‌ی ایمن SCs تأثیرگذار است (۲۷، ۱۴).

به طور کلی، با تغییر برنامه‌ی سلول‌ها، تغییرات ژنومیک مختلفی ایجاد می‌شود. برای مثال، تحقیقات نشان داده است که حتی در برخی بیماری‌های ژنتیک به دلیل تکرار سه نوکلئوتیدی، در طی تغییر برنامه، تغییر در طول تکرارها رخ می‌دهد. برای مثال، در آتاکسی فردریش (Friedreich's ataxia) تکرارهای توالی سه نوکلئوتیدی در زمان تغییر برنامه، در فیبروبلاست‌های بیمار رخ می‌دهد (۲۸). همچنین، در بیماران سندروم X شکننده، تغییرات تکراری خاص این سندروم در سلول‌هایی از این بیماران در زمان تغییر برنامه رخ می‌دهند. نکته‌ی جالب این است که در حالت In vivo، در مراحل اولیه‌ی جنین‌زایی نیز این اتفاق رخ می‌دهد (۳۰-۲۹). برای مثال، در زمانی که فیبروبلاست‌های بیماران سندرم داون تغییر برنامه می‌دهند، به طور معمول نسخه‌ی اضافه‌ی کروموزوم ۲۱ از دست می‌رود. از این رو، در بسیاری از افراد سندرم داون، حالت‌های موزاییسمی دیده می‌شود (۳۲-۳۱). همین بی‌ثباتی کروموزوم، از انواع متداول تغییرات ژنومی یافت شده در Human pluripotent stem cells (hPSCs) و نیز در کارسینوماهای جنینی در زمان تغییر برنامه است (۱۴).

متداول‌ترین ناهنجاری‌های ژنومی شناخته شده در MSCs

مطالعات مختلفی که بر روی MSCs انجام شده است، نشان می‌دهد که پایداری ژنومی این سلول‌ها بیش از سایر SCs است (۳۳). هر چند در این سلول‌ها نیز برخی ناهنجاری‌های ژنومی مشاهده شده است. مطالعه بر روی ۱۴۴ نمونه‌ی MSCs، نشان داد که بیشترین ناهنجاری در این سلول‌ها، تریزومی کروموزوم ۱۳ می‌باشد (۳۴). حال آن که مطالعه‌ی دیگری بیشترین میزان ناهنجاری مشاهده شده را تریزومی کروموزوم‌های ۵، ۸ و ۲۰ گزارش کرد (۳۵). البته این مطالعات، میزان این ناهنجاری‌ها را در سلول‌های افراد متفاوتی که سلول‌ها از آن‌ها جداسازی شده بود، متفاوت اعلام کرد. بنا بر این، احتمال آن وجود دارد که ژنتیک فرد اهدا کننده‌ی سلول در بروز ناهنجاری ژنومی در سلول‌ها طی کشت و تمایز، تأثیرگذار است. بنا بر این، بیشترین ناهنجاری‌های گزارش شده در MSCs، تغییر در تعداد کروموزوم‌ها می‌باشد که می‌توان با انجام کاریوتایپینگ در فواصل زمانی معین، وجود آن را بررسی کرد (۳۶). همچنین، گزارش‌هایی وجود دارد که نشان دهنده‌ی تغییر شکل خود به خودی MSCs در In vitro است. البته اطلاعاتی در دست نیست که به طور دقیق نشان دهد چرا این سلول‌ها در In vitro تومورزا می‌شوند (۳۸-۳۷، ۲۷).

متداول‌ترین ناهنجاری‌های ژنومی شناخته شده در iPSCs

مانند سایر SCs، استفاده از iPSCs نیز در تحقیقات و کارهای درمانی از جمله پزشکی بازساختی، به حفظ و ثبات ژنومیک این سلول‌ها بستگی دارد. در این سلول‌ها نیز تغییرات ژنتیک، برخی تصادفی و برخی مختص جایگاه خاصی هستند. برای این سلول‌ها، در کشت‌های طولانی مدت، ناهنجاری‌هایی شبیه آن چه در hESCs رخ می‌دهد، مانند انیوپلوئیدی‌هایی از جمله تریزومی ۱۲ و ۸ و ایزوکروموزوم 20q ذکر شده است. هر چند شباهت‌ها و اختلافات مهمی بین این دو نوع سلول وجود دارد، اما پروفایل‌های بیان ژن و متیلاسیون DNA در هر دو نوع سلول بسیار مشابه هستند. بیشترین تغییرات ژنومی در iPSCs، جهش‌هایی تأثیرگذار بر بیان ژن‌ها و پروتئینها هستند که در مناطق اگزونی (اگزوم) اتفاق می‌افتد. بیشتر این جهش‌ها، شامل Missense، Nonsense و Splice variants هستند که اغلب عملکرد پروتئین‌ها را به هم می‌زنند. تغییرات اپی‌ژنتیک نیز به طور مکرر برای این سلول‌ها گزارش شده است. برخی CNVs، تغییرات منحصر به فرد دیگری هستند که در کشت‌های طولانی مدت در iPSCs رخ می‌دهند. در مقابل این ناپایداری‌های ژنومی، رده‌هایی از این سلول‌ها که منشأ فیبروبلاستی دارند، به طور معمول کاریوتایپ‌های طبیعی خود را حفظ می‌کنند. از این رو، عده‌ای گمان می‌کنند که فرایند برنامه‌ریزی مجدد (Reprogramming)، عامل ناپایداری‌های بزرگ ژنومی نیست. البته مشخص نیست که ناهنجاری‌های ژنومی که در این سلول‌ها دیده می‌شوند، در زمان کشت و یا برنامه‌ریزی مجدد اتفاق افتاده‌اند (۳).

عوامل مؤثر در القای ناهنجاری‌های ژنومی در SCs

به طور کلی، ناهنجاری‌های ژنومیک ممکن است در هر کشت سلولی رخ دهد. در تحقیقات مختلفی از سراسر دنیا ثابت شده است که در بسیاری انواع SCs، در کشت‌های طولانی و متداول در پاساژهای آخر، حدود دو برابر پاساژهای اولیه تغییرات ژنومیک وجود دارد. بنا بر این، عامل زمان، یک عامل اصلی در بی‌ثباتی ژنومی در SCs است. این احتمال وجود دارد که در طی زمان در محیط کشت، ناهنجاری‌های ژنومیک تجمع پیدا می‌کنند (۳۹).

از طرفی، عوامل مختلفی در زمان تمایز در محیط کشت، ماهیت سلول‌ها را تغییر می‌دهند. برای مثال، برخی سلول‌ها ممکن است دستخوش تمایزهای اتفاقی شوند و سلول‌های تمایز یافته ممکن است نرخ تقسیم سریع‌تر یا سازگاری بهتری با شرایط کشت پیدا کنند و در کشت‌های متوالی این حالت به شدت انتخابی باشد (۱۴). به تازگی مشخص شده است که یکی دیگر از عوامل بسیار مهم که می‌تواند در ایجاد ناهنجاری‌های ژنومی در محیط کشت مؤثر باشد، چگالی سلول‌ها حین کشت و تکثیر است. در مطالعه‌ای که بر روی

hESCs انجام گرفته است، مشاهده شدکه چگالی بالای سلول‌ها در محیط کشت، باعث افزایش ناهنجاری‌های ژنومی در این سلول‌ها می‌شود. علت افزایش این ناهنجاری‌ها در محیط‌های دارای چگالی بالا، می‌تواند ناشی از اسیدیته‌ی محیط به دنبال تولید و تجمع اسید لاکتیک باشد. بنا بر این، کاهش چگالی سلولی و یا افزایش تعداد دفعات تعویض محیط کشت، می‌تواند میزان وقوع این ناهنجاری‌ها را کاهش دهد (۴۰). عوامل مختلفی شناسایی شده‌اند که بر نوع و میزان ناهنجاری ژنومی ایجاد شده تأثیر می‌گذارند. از جمله‌ی این عوامل، می‌توان به منشأ سلول‌ها یا محل جداسازی، شیوه‌نامه و روش جداسازی و مشتق گرفتن سلول از منبع اولیه، شرایط تکثیر سلول‌ها، مدت زمان کشت و تکنیک‌های استفاده شده برای بررسی، اشاره کرد (۳۳).

جلوگیری از ایجاد ناهنجاری‌های ژنومی در SCs

تا کنون راهی برای حفظ انسجام ژنوم SCs پیدا نشده است. هر چند مطالعات در این زمینه کافی نیست و گزارش‌های چندانی نیز از خطرزا بودن این سلول‌ها برای بیماران گزارش نشده است (۴۱، ۱۴)؛ اما از آن جا که مشخص نیست سلول‌ها با تغییرات ژنومیک کسب شده در حین دست‌ورزی در محیط کشت می‌توانند در طولانی مدت و یا پس از انتقال به بیماران، دچار تغییر شکل گردند؛ منطقی است با بررسی‌های بیشتر و استفاده از دستورالعملهای استاندارد، از طریق اصلاح نمودن محیط و شرایط کشت، بهینه‌ترین زمان و شرایط را فراهم نمود تا این تغییرات را به حداقل ممکن رساند (۲۷). از این رو، پیشنهاد می‌شود تا حد امکان، شرایط بهینه‌ای فراهم شود تا انسجام ژنوم محفوظ بماند. از جمله‌ی این عوامل، استاندارد نمودن دست‌ورزی سلول‌ها شامل حداقل تعداد پاساژ، انجام پاساژها به صورت ملایم، حداقل تعداد فریز و دفریز کردن سلول‌ها و تعویض محیط کشت به طور مستمر می‌باشد که تا حدودی بر حفظ ثبات ژنوم تأثیرگذار هستند. همچنین، شرایط محیط کشت از جمله میزان اکسیژن، فعالیت اینتگرینی، میزان فعالیت Cyclin-dependent kinase2 (CDK2) و استفاده از محیط‌های کشت غنی در این زمینه تأثیرگذار می‌باشند (۲۱). بنا بر این، کاهش مدت زمان رشد و تمایز سلول‌ها در خارج از بدن و کشت سلول‌ها با چگالی سلولی مناسب و تعویض محیط برای جلوگیری از تجمع اسید لاکتیک، می‌تواند میزان بروز ناهنجاری‌های ژنومی را کاهش دهد (۴۰).

روش‌های ارزیابی ناهنجاری‌های ژنومی در سلول‌های بنیادی

همان‌طور که ذکر شد، برخی ناهنجاری‌های ژنومی متداول و برخی اختصاصی نوع SCs هستند. انواع ناهنجاری‌های ژنومیک از جهش‌های نقطه‌ای تا ناهنجاری در قسمتی از یک کروموزوم از جمله مضاعف شدگی و حذف‌ها تا انیوپلوئیدی‌های تمامی کروموزوم‌ها مانند موزاییسم‌ها در انواع SCs در حال کشت و تمایز In vitro رخ می‌دهد (۴۲،۲۵، ۱۴). برای مثال، در درصد بالایی از رده‌های hPSCs، تریزومی کروموزوم‌های شماره‌ی ۱، ۱۲، ۱۷ و X و Amplification کروموزوم ۲۰ مشاهده می‌شود، اما در MSCs، حذف کروموزوم ۱۳ متداول‌تر است (۴۳، ۱۲). از این رو، با توجه به گزارش‌هایی که تا کنون از ناهنجاری‌های هر نوع SCs، منتشر شده است و با توجه به ویژگی‌های اختصاصی روش‌های بررسی این ناهنجاری‌ها که به طور خلاصه در جدول ۱ آمده است، پیشنهاد می‌شود که سلول‌ها قبل از استفاده‌های درمانی، از جهت ناپایداری‌های ژنومی، بررسی شوند.

جدول ۱. انتخاب روش‌های مختلف بررسی ناهنجاری‌های ژنومی

روش بررسی	فواید	نقایص
G-banding karyotype	آشکارسازی سریع تعداد زیادی از ناهنجاری‌ها نظیر موزاییسم، ناهنجاری‌های ساختاری و واژگونی‌ها	محدوده‌ی شناسایی، تغییرات بیش از ۵ Mb است. همچنین، عملکرد ژن‌های مربوط را مشخص نمی‌کند.
FISH و SKY	شناسایی و دسته‌بندی ناهنجاری‌های ساختاری ژنومی	محدوده‌ی شناسایی، تغییرات بیش از ۵ Mb است. همچنین، عملکرد ژن‌های مربوط را مشخص نمی‌کند.
Array CGH و Array SNP	هر دو روش حساسیت بالا، وضوح بیش از ۵۰ kb و قابلیت تشخیص موزاییسم‌ها را دارند. با روش SNP array همچنین موارد LOH قابل تشخیص است.	پرهزینه و وقت‌گیر هستند. عملکرد ژن‌های تغییر یافته را نشان نمی‌دهند. نمونه‌ها تنها زمانی قابل مقایسه هستند که بر روی سطح یکسانی قرار گیرند.
Whole genome sequencing	حساسیت بالا با وضوح یک باز. قابلیت شناسایی موزاییسم‌ها.	پرهزینه و وقت‌گیر هستند. عملکرد ژن‌های تغییر یافته را نشان نمی‌دهند. نمونه‌ها تنها زمانی قابل مقایسه هستند که بر روی سطح یکسانی قرار گیرند.
Global gene expression Meta-analysis	بررسی عملکردی ناهنجاری‌های ژنومی	محدوده‌ی شناسایی، تغییرات بیش از ۱۰ Mb است و تنها برای ژن‌هایی به کار می‌روند که در نمونه بیان می‌شوند. قابلیت تشخیص موزاییسم‌ها را ندارند.

FISH: Fluorescence in situ hybridization; SKY: Spectral karyotyping; Array CGH: Array comparative genomic hybridization; Array SNP: Array single nucleotide polymorphisms

برای مثال، با روش‌هایی نظیر Array CGH (Array comparative genomic hybridization) وضوح روش‌های کاریوتایپینگ افزایش می‌یابد و تغییرات با اندازه‌های کوچک‌تر نیز قابل بررسی هستند. از این رو، CNVs که شامل کاهش یا افزایش یک یا چند ژن هستند و به میزان بالا در حین کشت در iPSCs، تغییر می‌یابند، با این روش قابل بررسی می‌باشند (۳).

با استفاده از ژنوتایپینگ Single nucleotide polymorphisms (SNP) برای اولین بار در مقیاس وسیع، تغییرات ژنومیک در طی تمایز SCs گزارش شده است. تاکنون، بنا بر نوع تغییر ژنومیک، از G-banding karyotype، Fluorescence in situ hybridization (FISH)، Spectral karyotyping (SKY)، Array microarray-based comparative genomic hybridisation (Array microarray-based CGH)، Array SNP و بررسی تمام ژنوم با استفاده از Whole genome sequencing جهت پی‌گیری در مطالعات مختلف استفاده شده است (۴۴). هر یک از روش‌های پیش‌گفته، با توجه به نوع سلول‌ها و فراوان‌ترین ناهنجاری‌های متداول در آن‌ها، مورد استفاده قرا ر می‌گیرند..

نتیجه‌گیری

سلول‌های بنیادی جزء جدا نشدنی درمان‌های مبتنی بر سلول و پزشکی باز ساختی هستند و افق‌های روشنی را در درمان بسیاری از بیماری‌های سخت و بدون درمان پیش رو قرار داده‌اند (۴، ۲)، اما از طرفی، از مهم‌ترین چالش‌های استفاده از این سلول‌ها، ناپایداری ژنومی آن‌ها و ناهنجاری‌های ژنومی ناشی از آن است که در محیط کشت ایجاد و به صورت بالقوه عامل ایجاد تومور و سرطان هستند. هر چند گزارشی مبنی بر سرطان‌زا بودن این سلول‌ها پس از پیوند وجود ندارد، اما لازم است سلول‌ها از این جهت بررسی و ایمنی استفاده و پیوند آن‌ها تضمین شود (۴۱، ۱۴). این ناهنجاری‌های ژنومی، از جهش‌های نقطه‌ای و ناهنجاری در قسمتی از یک کروموزوم از جمله مضاعف شدگی و حذف‌ها تا انیوپلوئیدی‌های تمامی کروموزوم‌ها مانند موزاییسم‌ها در انواع مختلف سلول‌های بنیادی در حال کشت و تمایز می‌تواند رخ دهد (۲۵، ۱۴).

میزان رخ دادن چنین ناهنجاری‌هایی در انواع مختلف سلول‌های بنیادی متفاوت است و به عوامل متعددی بستگی دارد (۳۳). مطالعات مختلفی بر روی انواع سلول‌های بنیادی انجام شده و بیشترین ناهنجاری‌های رخ داده در این سلول‌ها را گزارش کرده‌اند. از این رو، پیشنهاد می‌گردد با استفاده از اطلاعات ارایه شده در این مطالعات، بهینه‌ترین شرایط کشت و تمایز فراهم گردد و با استفاده از روش‌های پیش‌گفته، SCs حین تکثیر و یا قبل از پیوند بررسی گردد تا خطرات ناشی از پیوند سلول‌ها، به حداقل ممکن برسد. از طرفی، بهتر است انواع این تغییرات تومورزا شناسایی شوند و سپس مزایا و معایب انتقال SCs به بیمار و نیز عواقب آن سنجیده شود تا در حد امکان، بروز عواقب ناخواسته کاهش یابد.

References

1. Alizadeh A, Tarihi T, Dashtnavard H. The Influence of lithium chloride on induction of bone marrow stromal cells into neuronal phenotype. Daneshvar Med 2009; 16(79); 51-6. [In Persian].
2. Eftekharzadeh M, Nobakht M, Alizadeh A, Soleimani M, Hajghasem M, Kordestani SB, et al. The effect of intrathecal delivery of bone marrow stromal cells on hippocampal neurons in rat model of Alzheimer's disease. Iran J Basic Med Sci 2015; 18(5): 520-5.
3. Martins-Taylor K, Xu RH. Concise review: Genomic stability of human induced pluripotent stem cells. Stem Cells 2012; 30(1): 22-7.
4. Golipoor Z, Mehraein F, Zafari F, Alizadeh A, Ababzadeh S, Baazm M. Migration of Bone Marrow-Derived Very Small Embryonic-Like Stem Cells toward An Injured Spinal Cord. Cell J 2016; 17(4): 639-47.
5. Caplan AI. Adult mesenchymal stem cells for tissue engineering versus regenerative medicine. J Cell Physiol 2007; 213(2): 341-7.
6. Alizadeh A, Soleimani M, Ai J, Fallah A, Hashemian SJ, et al. Lentiviral mediated overexpression of NGF in adipose-derived stem cells. Clon Transgen 2015; 4(3): 142.
7. Bakhshayesh M, Soleimani M, Mehdizadeh M, Katebi M. Effects of TGF-beta and b-FGF on the potential of peripheral blood-borne stem cells and bone marrow-derived stem cells in wound healing in a murine model. Inflammation 2012; 35(1): 138-42.
8. Tarahani Nia M, Alizadeh A, Takhshid MA, Sadroddiny E. Decellularization of lung tissue and analysis of its differentiative potential on bone marrow mesenchymal stem cells of rat. Appl Tissue Eng 2015; 2(1): 1-11.
9. Mitalipova MM, Rao RR, Hoyer DM, Johnson JA, Meisner LF, Jones KL, et al. Preserving the genetic integrity of human embryonic stem cells. Nat Biotechnol 2005; 23(1): 19-20.
10. Cowan CA, Klimanskaya I, McMahon J, Atienza J, Witmyer J, Zucker JP, et al. Derivation of embryonic stem-cell lines from human blastocysts. N Engl J Med 2004; 350(13): 1353-6.
11. Lund RJ, Narva E, Lahesmaa R. Genetic and epigenetic stability of human pluripotent stem cells. Nat Rev Genet 2012; 13(10): 732-44.
12. Mayshar Y, Ben-David U, Lavon N, Biancotti JC, Yakir B, Clark AT, et al. Identification and classification of chromosomal aberrations in human

induced pluripotent stem cells. Cell Stem Cell 2010; 7(4): 521-31.
13. Ghasemi S, Mozdarani H, Soleimani M. The Effect of miR-372 on genome instability in MKN-45 cell line. J Isfahan Med Sch 2015; 32(311): 2035-47.
14. Peterson SE, Loring JF. Genomic instability in pluripotent stem cells: implications for clinical applications. J Biol Chem 2014; 289(8): 4578-84.
15. Lefort N, Perrier AL, Laabi Y, Varela C, Peschanski M. Human embryonic stem cells and genomic instability. Regen Med 2009; 4(6): 899-909.
16. Seminatore C, Polentes J, Ellman D, Kozubenko N, Itier V, Tine S, et al. The postischemic environment differentially impacts teratoma or tumor formation after transplantation of human embryonic stem cell-derived neural progenitors. Stroke 2010; 41(1): 153-9.
17. Ben-Porath I, Thomson MW, Carey VJ, Ge R, Bell GW, Regev A, et al. An embryonic stem cell-like gene expression signature in poorly differentiated aggressive human tumors. Nat Genet 2008; 40(5): 499-507.
18. Yang S, Lin G, Tan YQ, Zhou D, Deng LY, Cheng DH, et al. Tumor progression of culture-adapted human embryonic stem cells during long-term culture. Genes Chromosomes Cancer 2008; 47(8): 665-79.
19. Ballabeni A, Park IH, Zhao R, Wang W, Lerou PH, Daley GQ, et al. Cell cycle adaptations of embryonic stem cells. Proc Natl Acad Sci USA 2011; 108(48): 19252-7.
20. Varela C, Denis JA, Polentes J, Feyeux M, Aubert S, Champon B, et al. Recurrent genomic instability of chromosome 1q in neural derivatives of human embryonic stem cells. J Clin Invest 2012; 122(2): 569-74.
21. Weissbein U, Benvenisty N, Ben-David U. Quality control: Genome maintenance in pluripotent stem cells. J Cell Biol 2014; 204(2): 153-63.
22. Liang Q, Conte N, Skarnes WC, Bradley A. Extensive genomic copy number variation in embryonic stem cells. Proc Natl Acad Sci USA 2008; 105(45): 17453-6.
23. Nguyen HT, Geens M, Mertzanidou A, Jacobs K, Heirman C, Breckpot K, et al. Gain of 20q11.21 in human embryonic stem cells improves cell survival by increased expression of Bcl-xL. Mol Hum Reprod 2014; 20(2): 168-77.
24. Taapken SM, Nisler BS, Newton MA, Sampsell-Barron TL, Leonhard KA, McIntire EM, et al. Karyotypic abnormalities in human induced pluripotent stem cells and embryonic stem cells. Nat Biotech 2011; 29(4): 313-4.
25. Avery S, Hirst AJ, Baker D, Lim CY, Alagaratnam S, Skotheim RI, et al. BCL-XL mediates the strong selective advantage of a 20q11.21 amplification commonly found in human embryonic stem cell cultures. Stem Cell Reports 2013; 1(5): 379-86.
26. Werbowetski-Ogilvie TE, Morrison LC, Fiebig-Comyn A, Bhatia M. In vivo generation of neural tumors from neoplastic pluripotent stem cells models early human pediatric brain tumor formation. Stem Cells 2012; 30(3): 392-404.
27. Wang Y, Han ZB, Song YP, Han ZC. Safety of mesenchymal stem cells for clinical application. Stem Cells Int 2012; 2012: 652034.
28. Ku S, Soragni E, Campau E, Thomas EA, Altun G, Laurent LC, et al. Friedreich's ataxia induced pluripotent stem cells model intergenerational GAATTC triplet repeat instability. Cell Stem Cell 2010; 7(5): 631-7.
29. Sheridan SD, Theriault KM, Reis SA, Zhou F, Madison JM, Daheron L, et al. Epigenetic characterization of the FMR1 gene and aberrant neurodevelopment in human induced pluripotent stem cell models of fragile X syndrome. PLoS One 2011; 6(10): e26203.
30. Devys D, Biancalana V, Rousseau F, Boue J, Mandel JL, Oberle I. Analysis of full fragile X mutations in fetal tissues and monozygotic twins indicate that abnormal methylation and somatic heterogeneity are established early in development. Am J Med Genet 1992; 43(1-2): 208-16.
31. Li LB, Chang KH, Wang PR, Hirata RK, Papayannopoulou T, Russell DW. Trisomy correction in Down syndrome induced pluripotent stem cells. Cell Stem Cell 2012; 11(5): 615-9.
32. Maclean GA, Menne TF, Guo G, Sanchez DJ, Park IH, Daley GQ, et al. Altered hematopoiesis in trisomy 21 as revealed through in vitro differentiation of isogenic human pluripotent cells. Proc Natl Acad Sci U S A 2012; 109(43): 17567-72.
33. Afonso CD, Batistuzzo de Medeiros SR. Genetic evaluation of mesenchymal stem cells. Rev Bras Hematol Hemoter 2014; 36(4): 238-40.
34. Ben-David U, Mayshar Y, Benvenisty N. Large-scale analysis reveals acquisition of lineage-specific chromosomal aberrations in human adult stem cells. Cell Stem Cell 2011; 9(2): 97-102.
35. Tarte K, Gaillard J, Lataillade JJ, Fouillard L, Becker M, Mossafa H, et al. Clinical-grade production of human mesenchymal stromal cells: occurrence of aneuploidy without transformation. Blood 2010; 115(8): 1549-53.
36. Borgonovo T, Vaz IM, Senegaglia AC, Rebelatto CL, Brofman PR. Genetic evaluation of mesenchymal stem cells by G-banded karyotyping in a Cell Technology Center. Rev Bras Hematol Hemoter 2014; 36(3): 202-7.
37. Ren Z, Wang J, Zhu W, Guan Y, Zou C, Chen Z, et al. Spontaneous transformation of adult mesenchymal stem cells from cynomolgus macaques in vitro. Exp Cell Res 2011; 317(20): 2950-7.
38. Serakinci N, Fahrioglu U, Christensen R. Mesenchymal stem cells, cancer challenges and new directions. Eur J Cancer 2014; 50(8): 1522-30.
39. Amps K, Andrews PW, Anyfantis G, Armstrong L, Avery S, Baharvand H, et al. Screening ethnically diverse human embryonic stem cells identifies a chromosome 20 minimal amplicon conferring growth advantage. Nat Biotechnol 2011; 29(12): 1132-44.
40. Jacobs K, Zambelli F, Mertzanidou A, Smolders I, Geens M, Nguyen HT, et al. Higher-Density Culture in Human Embryonic Stem Cells Results in DNA Damage and Genome Instability. Stem Cell Reports 2016; 6(3): 330-41.

41. Herberts CA, Kwa MS, Hermsen HP. Risk factors in the development of stem cell therapy. J Transl Med 2011; 9: 29.
42. Peterson SE, Westra JW, Rehen SK, Young H, Bushman DM, Paczkowski CM, et al. Normal human pluripotent stem cell lines exhibit pervasive mosaic aneuploidy. PLoS One 2011; 6(8): e23018.
43. Liang Y, Zhong Z, Huang Y, Deng W, Cao J, Tsao G, et al. Stem-like cancer cells are inducible by increasing genomic instability in cancer cells. J Biol Chem 2010; 285(7): 4931-40.
44. Catalina P, Cobo F, Cortes JL, Nieto AI, Cabrera C, Montes R, et al. Conventional and molecular cytogenetic diagnostic methods in stem cell research: a concise review. Cell Biol Int 2007; 31(9): 861-9.

Journal of Isfahan Medical School
Received: 16.04.2016
Vol. 34, No. 383, 3rd Week, July 2016
Accepted: 25.05.2016

Importance of Analyzing the Genomic Instability in Stem Cell-Based Therapies

Akram Alizadeh[1], Sorayya Ghasemi[1]

Review Article

Abstract

Stem cells are the main component in cell-based therapies and regenerative medicine to replace damaged tissues and cure various diseases. In regenerative medicine, in vitro stem cells' culture is required for proliferation and differentiation. Although the risk of using these cells has not been established; but in addition to the possibility of spontaneous differentiation of undifferentiated cells after transplantation and teratoma formation, genome of these cells in culture media is instable and can be changed. Genomic instability can affect the transplantation safety of these cells or tissues derived from them. Genomic instability is one of the common features in stem cells and cancer. Hence, there is concern that the genomic instability during the manipulation of stem cells can be tumorigenic. Genomic instabilities are included in different sizes from point mutation to aneuploidy and mosaicism. Types of stem cells, culture conditions and some manipulation of cells such a long time are effective in creation and the rate of these instabilities. Therefore, in addition to optimizing the time and culture conditions, it is recommended to examine and follow the genomic abnormalities before therapeutic uses with appropriate methods.

Keywords: Genomic instability, Stem cells, Cell-based therapy

Citation: Alizadeh A, Ghasemi S. **Importance of Analyzing the Genomic Instability in Stem Cell-Based Therapies.** J Isfahan Med Sch 2016; 34(383): 572-9.

1- Assistant Professor, Cellular and Molecular Research Center, Shahrekord University of Medical sciences, Shahrekord, Iran
Corresponding Author: Sorayya Ghasemi, Email: s.ghasemi@skums.ac.ir