فهرست مطالب

فصل اول: اربتروپویز قطعی از سلول‌های بنیادی پر توان پیشرفت‌ها و چشم اندازهای قطعی ۱۱

فصل دوم: مقایسه محیط اطراف سلول‌های بنیادی خون ساز با اسپرماتوگنیال از جنبه پزشکی بازساختی ۲۵

فصل سوم: سلول‌های بنیادی دندانی و بازسازی دندان ۵۱

فصل چهارم: چالش‌ها در ساخت زیستی محیط کشت‌های شبه اندام ۶۳

فصل پنجم: داربست‌های زیست مهندسی شده برای کاربردهای سلول بنیادی در مهندسی بافت و پزشکی بازساختی ۸۳

فصل ششم: سلول‌های بنیادی مزانشیمی و زیست سرامیک‌های کلسیم فسفات: پیامدها در بازسازی استخوان پریودنتال ۹۹

فصل هفتم: سلول‌های بنیادی دندانی در مهندسی بافت استخوان: بررسی اجمالی و چالش‌های کنونی ۱۲۱

فصل هشتم: مواد بر پایه‌ی گرافن در بازسازی بافت عصبی ۱۳۷

فصل نهم: جایگزین‌های پوستی مهندسی بافت شده ۱۵۱

فصل دهم: مواد زیستی و پزشکی بازساختی در اورولوژی ۱۹۹

واژه یاب ۲۰۹

پیشگفتار مترجمین

پیامبر اکرم (ص) می‌فرمایند:

علم را، با نوشتن در بند کشید.

آرزوی ساخت اعضای بدن انسان یا ترمیم بافت‌ها و اندام‌ها، تاریخ دیرینه‌ای دارد و ردپای آن را می‌توان در انسان‌های کهن یافت. پزشکی بازساختی از دیدگاه علمی شاخه‌ای جدید از پزشکی است که با استفاده از دانش سلول‌های بنیادی و مهندسی بافت دو هدف اصلی را دنبال می‌کند. هدف اول بازسازی بافت آسیب دیده است تا این بافت بتواند به فعالیت فیزیولوژیک خود ادامه دهد. هدف دوم، تولید بافت، یا اندام‌هایی است که بتوانند به عنوان جایگزین بافت آسیب‌دیده پیوند شوند.

از آنجایی‌که استفاده از سلول‌های بنیادی و مهندسی بافت به عنوان روش‌های درمانی نوین، پنجره‌ی امیدی برای درمان بیماری‌های صعب‌العلاج یا لاعلاج باز کرده‌اند، ما کتابی را برای شما انتخاب و ترجمه کرده‌ایم که کامل‌ترین و به‌روزترین اطلاعات در رابطه با سلول‌های بنیادی از جمله جایگاه این سلول‌ها در پزشکی بازساختی را در بر داشته باشد. همچنین با خواندن این کتاب با دانش مهندسی بافت و دستاوردهای آن از گذشته تا به امروز در بازسازی بافت‌های آسیب‌دیده از جمله بافت عصبی، پوست و اورولوژی آشنا می‌شوید. از دیگر امتیازات این کتاب که باعث جلب توجه ما به آن شد، زبان روان کتاب است، بطوری‌که اگر شما خواننده محترم دانش اندکی از مهندسی بافت و سلول‌های بنیادی داشته باشید، مطالب را به طور کامل می‌توانید درک کنید.

امیدواریم خوانندگان پس از اتمام مطالعه کتاب، با دیدی وسیع‌تر و علاقه‌ای افزون‌تر پیگیر علوم پزشکی بازساختی شوند، تا گامی هرچند کوچک برای پیشرفت کشور عزیزمان ایران در زمینه درمان بوسیله‌ی روش‌های نوین برداشته باشیم.

پاییز ۱۴۰۱

پیشگفتارنویسنده

پتانسیل رشد متنوع سلول‌های بنیادی برای چندین دهه شناخته شده است. با این حال، رویکردهای مرتبط بالینی برای قرار دادن سلول‌های بنیادی در محیط‌های آسیب‌دیده و حتی متخاصم، در حالی که توانایی آن‌ها برای بیان پتانسیل ذاتی خود برای دستیابی به ترمیم و بازسازی را حفظ می‌کنند، همچنان چالش‌برانگیز هستند. بیومواد پیشرفته و روش‌های مهندسی بافت چند وجهی به طور فزاینده‌ای وارد بازی می‌شوند. شناسایی سلول‌های مناسب و در بسیاری از موارد، سایر واسطه‌های بیولوژیکی و شیمیایی مورد نیاز، همراه با مواد زیستی بهینه برای کپسوله‌سازی و تحویل آن‌ها به منظور تحریک فرآیندهای بازسازی، همچنان در حال بررسی و توسعه است. با چالش‌ها و پیشرفت‌های متعددی که در این زمینه بسیار فعال رخ می‌دهد، من چندین متخصص را در این حوزه جذب کرده‌ام تا خلاصه‌ای از مطالعات تحقیقاتی در حال انجام خود را ارائه دهند.

من از پیتر باتلر، مدیر تحریریه، و مران لویداوون، سردبیر ارشد، برای حمایت مداوم آنها از این مجموعه که ما شروع کرده‌ایم بسیار سپاسگزارم.

همچنین مایلم از سارا ژرمنز-هویزمن، دستیار ویراستار، به خاطر تلاش‌های برجسته‌اش در رساندن حجم به مراحل تولید تشکر و قدردانی کنم.

همچنین تشکر ویژه‌ای از گروه تولید برای کارشان می‌شود.

در نهایت، من از مشارکت کنندگان نه تنها به خاطر حمایتشان از کتاب، بلکه به خاطر تلاش‌هایشان برای گرفتن پیشرفت‌ها و موانع باقی مانده در حوزه‌های تحقیقاتی‌شان تشکر می‌کنم. من از تلاش‌های آنها سپاسگزارم و اعتماد خوانندگان برای مشارکت آنها جالب و مفید خواهد بود.

Kursad Turksen
Ottawa, ON, Canada

فصل اول

اریتروپویز قطعی از سلول‌های بنیادی پرتوان

پیشرفت‌ها و چشم اندازهای قطعی

Selami Demirci and John F.Tisdale

چکیده

یکی از موارد مهم بالینی، استخراج گلبول‌های قرمز بالغ[1] و عملکردی همراه با بیان گلوبین بالغ از منابع تجدیدپذیر مانند سلول‌های بنیادی پرتوان القایی[2] می‌باشد. تنها سلول‌های بنیادی خونساز بالغ[3] می‌توانند گلبول‌های قرمز خون را تولید کنند. تلاش‌های زیادی برای تهیه HSCهای قابل پیوند قطعی از iPSCها انجام شد. اما نتیجه آن در نمونه‌های موشی به دلیل تعداد پایین، ماندگاری کم و وابستگی به رده، رضایت‌بخش نبود. علاوه بر این روش‌های تمایز خارج از بدن[4] به گلبول‌های قرمز ختم شد، جالب‌تر اینکه، با معرفی ابزارهای ویرایش ژنوم نسبتاً کارآمد و آسان، اصلاح ژنتیکی برای اختلالات ارثی RBC مانند بیماری سلولی داسی شکل[5] از طریق iPSCها امکان‌پذیر می‌شود که متعاقباً می‌تواند HSCهای بالغ و کافی ایجاد کنند. سپس HSCها پس از پیوند باعث تولید گلبول‌های قرمز بالغ می‌شوند که بتا گلوبین تولید می‌کنند. برای ایجاد پروتکل‌های آزمایشگاهی قابل اعتماد، استاندارد و مؤثر، باید دانش خود را در مورد خون‌سازی یا اریتروپویزیس و شناسایی مسیرهای سیگنالینگ تنظیمی حیاتی و عوامل رونویسی گسترش دهیم. هنگامی که با این چالش‌ها روبرو شدیم، می‌توانیم پروتکل‌های تمایز را برای تولید انبوه RBC با هدف انتقال خون در محیط بالینی، انجام غربالگری دارو و مدل‌سازی بیماری در شرایط خارج از بدن، و بررسی آبشار جنینی اریتروپویزیس، ایجاد کنیم.

واژگان کلیدی

سلول‌های بنیادی جنینی، اریتروسیت‌ها، اندوتلیوم هوموژنیک، بتاگلوبین

اختصارات

AGM: Aorta-gonad-mesonephros

BMPs: Bone morphogenetic proteins

BMT: Bone marrow transplantation

EBs: Embryoid bodies

EHT: Endothelial-to-hematopoietic transition

EMPs: Erythromyeloid progenitors

EryD: Definitive erythrocytes

EryP: Primitive erythrocytes

ESCs: Embryonic stem cells

FGF2: Fibroblast growth factor 2

FLT-3: Fms-like tyrosine kinase 3

HLA: Human leukocyte antigen

HSCs: Hematopoietic stem cells

ILs: Interleukins

iPSCs: Induced pluripotent stem cells

1. RBCs
2. iPSCs
3. HSC
4. ex vivo
5. SCD

RBCs: Red blood cells

SCD: Sickle cell disease

SCF: Stem cell factor

TPO:Thrombopoietin

VEGF: Vascular endothelial growth factor

۱ سلسله مراحل تکامل اریتروپویزیس

دانش خونسازی جنینی پستانداران بیشتر از طریق آزمایش موش و تعداد محدودی از مطالعات انسانی به دست آمده است. در طی رشد جنینی، ۱۰ نوع سلول خونی مختلف تولید می‌شود و از میان آن‌ها، سلول‌های اریتروئیدی که مواد مغذی ضروری برای رشد جنین را تأمین می‌کنند، ویسکوزیته خون را تنظیم می‌کنند و تنش برشی لازم برای توسعه شبکه عروقی را تشکیل می‌دهند. گلبول‌های قرمز خون[1] توسط مجموعه‌ای از رویدادهای بسیار منظم و کاملاً هماهنگ در طول رشد جنینی تولید می‌شوند (Barminko et al. ۲۰۱۶) تولید RBC حداقل در ۳ موج متوالی و همپوشان صورت می‌گیرد. اولین موج در کیسه زرده در جزایر خون ظاهر می‌شود، که منجر به تولید اولین سلول‌های خونساز جنینی قابل شناسایی از نظر مورفولوژیکی، گلبول‌های قرمز بزرگ هسته‌دار اولیه[2] می‌شود که در درجه اول نیازهای جنین مانند اکسیژن، همراه با ماکروفاژها و مگاکاریوسیت‌های اولیه و T را تأمین می‌کند. (تاوین و پیلت، ۲۰۰۳، توبر و همکاران، ۲۰۰۷). اریتروسیت‌های اولیه در روزهای ۷/۲۵ تا ۸/۷۵ در جنین موش و هفته‌ی ۳ تا ۴ از حاملگی انسان دیده می‌شوند. (ون هندل و همکاران، ۲۰۱۰). اعتقاد بر این است که منشاء EryP اولیه از اجداد مزودرمی که در مجاورت اندودرم احشایی هستند، مشتق شده است که برای تبدیل خونساز و اندوتلیال کارآمد مورد نیاز است. (بارون ۲۰۰۵). عوامل محلول ترشح شده از این ناحیه شامل پروتئین‌های مورفوژنتیک استخوان[3]، جوجه تیغی هندی و فاکتور رشد اندوتلیال عروقی[4] برای تنظیم ظهور و گسترش سلول‌های EryP در طول بارداری تأیید شده‌اند. (بارمینکو و همکاران، ۲۰۱۶). شناسایی و ردیابی سلول‌های EryP به دلیل نبود شناساگرهای مشخص، پیچیده می‌باشد.

نشان داده شده است که Tie-۲، CD۳۱، اندوگلین[5]، CD۳۴ و VE کادهرین[6] در سلول‌های EryP موش بیان می‌شوند، اما این نشانگرها توسط سلول‌های اندوتلیال نیز بیان می‌شوند (اما و همکاران، ۲۰۰۶). با وجود اینکه سلول‌های EryP با همتایان قطعی خود ویژگی‌های مشترکی از جمله پتانسیل تقسیم سلولی، تجمع هموگلوبین، کاهش اندازه سلولی و محتوای RNA دارد، اما بیان زنجیره گلوبین آن همتای خودش است. (پالیس، ۲۰۱۴). این باور که سلول‌های EryP در تمام طول بارداری هسته‌دار هستند در مدت زمان طولانی وجود داشت و در نهایت با گزارش اکستروژن (انفصال) هسته‌ای توسط E۱۲,۵ ملقی شد. (کینگزلی و همکاران، ۲۰۰۴). فرایند هسته‌زایی سلول‌های EryP با استفاده از روش‌های مختلفی تأیید شده است. در حالی که تعداد سلول‌های EryP در طول دوره بارداری ثابت باقی می‌ماند. (بارون، ۲۰۱۳)

موج دوم نیز در کیسه زرده شروع می‌شود، که اریتروپویزیس قطعی[7] را در E ۸/۲۵ در موش (Palis et al. ۱۹۹۹) و در حدود هفته ۴ در انسان (Migliaccio et al. ۱۹۸۶) ایجاد می‌کند، که نشان دهنده همپوشانی نسبی بین خونسازی اولیه و نهایی در کیسه زرده می‌باشد. در مطالعات موش‌ها، نشان داده شد که اجداد تولید شده توسط موج دوم خون‌سازی، سلول‌های بنیادی خونساز[8] نیستند که بنیاد کبد جنین و سیستم خونساز بدن بالغ را سازماندهی کنند، بلکه پیش‌سازهای اریترومیلوئیدی ($EMPs، CD41^+ c\text{-}kit^{++}$ CD۱۶/۳۲) هستند. بیان گلوبین‌های بالغ و انتقال به کبد جنین برای ایجاد میلواریتروپویز اولیه قبل از واگذاری مکان خود به صاحبان واقعی HSCها، را انجام می‌دهند. HSC (McGrath et al. ۲۰۱۵) هایی که توسط موج سوم خون‌سازی تولید می‌شوند به شیوه‌ای بسیار پیچیده‌تر و در مکان‌های مختلف جنین از جمله ناحیه آئورت-گناد-مزونفروس[9]، رگ‌های خونی اصلی و جفت قرار دارند. (بازبینی شده در (بارون ۲۰۱۳؛ Dzierzak و اسپک ۲۰۰۸؛ دیتادی و همکاران ۲۰۱۷)). خونسازی قطعی در ناحیه AGM در E ۱۱ شروع می‌شود و سپس تولید HSC در کیسه زرده در E ۱۲ شروع می‌شود، که احتمالاً به جمعیت HSC کبد جنین کمک می‌کند (Kumaravelu et al. ۲۰۰۲؛ Rowe et al. ۲۰۱۶). پس از مشخص شدن HSCهای قطعی، آن‌ها به سمت کبد، طحال، تیموس و در نهایت مغز استخوان جنین در پستانداران حرکت می‌کنند. در مورد نمایه بیان نشانگر سطح سلولی برای HSCها اتفاق نظر وجود ندارد.

غنی‌سازی HSC در زیرجمعیت‌ها گزارش شده است. ارزش کلی برای HSCها این است که آنها در جمعیت سلول‌هایی با نمایه بیان $CD34^+ CD38^- Thy1^+ CD45RA^-$ وجود دارند. (Doulatov et al.

1. RBCs
2. EryP
3. BMPs
4. VEGF
5. endoglin
6. VE-cadherin
7. EryD
8. HSCs
9. AGM

۲۰۱۲). با این حال، غنی‌سازی HSC ویژه مرحله‌ای در زیرجمعیت‌های مختلف به‌عنوان $CD34^{+}$ $CD38^{-lo/-}$ $CD90^{+}$ $GPI\text{-}80^{+}$ برای HSCs کبد جنین (پراشاد و همکاران ۲۰۱۵) و $CD34^{+}$ VE-cadher- in^{+} $CD45^{+}$ C-KIT^{+} THY-1^{+} Endoglin^{+} CD38/lo CD45RA RUNX1^{+} برای جمعیت سلولی HSCها در ناحیه پشتی آئورت در هفته ۴ تا ۶ جنین انسان گزارش شد. (ایوانوف و همکاران ۲۰۱۴). در کنار این تفاوت، HSCهای مشتق شده از منابع مختلف دارای قابلیت گسترش و پیوند متنوعی هستند. HSCهای مشتق شده از جنین E ۹/۵ و E ۱۰/۵ ترجیحاً نوزادان را بهتر پیوند می‌زنند، در حالی که HSCهای مشتق شده از کبد جنین E ۱۴/۵ یا مغز استخوان بزرگسالان به طور قوی‌تری به گیرندگان بزرگسال پیوند می‌زنند (Arora et al. ۲۰۱۴). سلول‌های پیش‌ساز خون در زمان‌های مختلف جنین دارای الگوهای بیان ژن و ویژگی‌های فنوتیپی متفاوتی از جمله تکثیر و نمایه سطح سلولی هستند که احتمالاً به دلیل قرار گرفتن در معرض جمعیت‌های مختلف در مراحل متفاوت هستند (Rowe et al. ۲۰۱۶). این تفاوت‌ها احتمالاً ویژگی‌های EryP و EryD را تعیین می‌کند. یکی از اصلی‌ترین ویژگی‌های متمایز بین EryP و EryD مشخصات بیان گلوبین آن‌ها است. EryP عمدتاً زنجیره‌های گلوبین جنینی (ζ- و ε-گلوبین) را با سطوح کمی از زیر واحدهای قطعی هموگلوبین (γ و α-گلوبین) بیان می‌کند (Iarovaia et al. ۲۰۱۸). سپس، بیان زنجیره گلوبین بتا به بیان گلوبین جنینی در پایان سه ماهه اول بارداری تغییر کرد، که توسط یک عنصر توالی بالادستی بزرگ به نام منطقه کنترل مکان[1] هدایت می‌شود (Bender et al. ۲۰۰۰؛ Bungert et al. ۱۹۹۵). در حالی که مکانیسم مولکولی دقیق سوئیچینگ گلوبین هنوز به خوبی مشخص نشده است، دخالت عوامل رونویسی مختلف، تغییرات اپی‌ژنتیکی و سازمان‌های ساختاری در سوئیچینگ گلوبین گزارش شده است (بازبینی در Iarovaia et al. ۲۰۱۸؛ Sankaran et al. ۲۰۱۰؛ Tallack and Perkins ۲۰۱۳)). پس از سه ماهه اول بارداری، زیر واحدهای گلوبین جنینی، Aγ) γ۱) و Gγ) γ۲)، غالب‌ترین زنجیره گلوبین بتا در جنین هستند (شکل ۲۰۰۵ Stamatoyannopoulos) (۱؛ Grosso et al. ۲۰۱۲). گلوبین جنین پس از تولد به گلوبین بالغ (β- و δ-گلوبین) تبدیل می‌شود و سهم آن در هموگلوبین کمتر از ۱٪ است و سلولی نیست اما در برخی از سلول‌های خاص به نام سلول‌های F متمرکز است. ایجاد مدل‌های ex vivo برای تحقیقات پایه، غربالگری دارو و مدل‌سازی بیماری علاوه بر این، داشتن سلول‌های خونی بالغ، عملکردی و با کیفیت بالا از سلول‌های پیش‌ساز با ظرفیت انبساط قوی، یک هدف رؤیایی برای درمان بیماری‌های مرتبط با خون از جمله بیماری سلول داسی شکل[2] است.

۲ اشتقاق گلبول‌های قرمز از سلول‌های بنیادی پرتوان (PSCs)

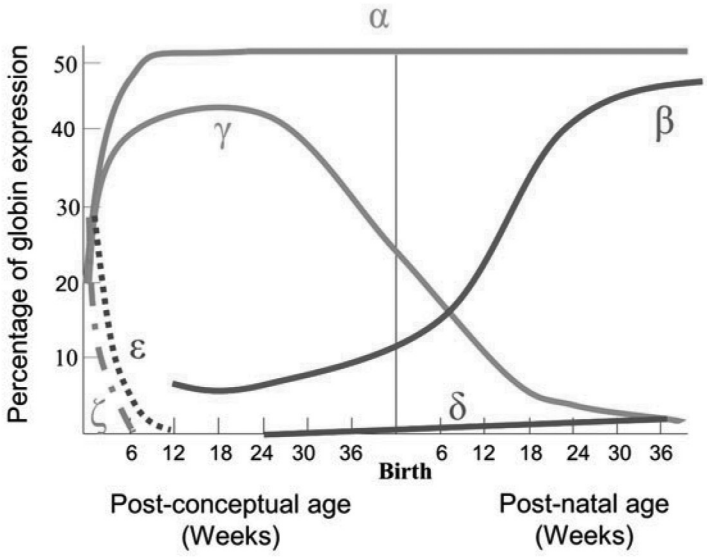
ایده اصلی برای درمان اختلالات مرتبط به خون، ریشه‌کن کردن تمام سلول‌های بیمار یا جهش‌یافته و پیوند HSCهای سالم درازمدت مجدد است. از آنجایی که مغز استخوان، اندام اولیه HSCها است که تکامل خون را در طول زندگی دوباره پر می‌کند، پیوند مغز استخوان (BMT) به طور گسترده برای درمان اختلالات خونی مختلف از جمله SCD و بتا تالاسمی استفاده می‌شود. در حالی که ۲۶ میلیون اهداکننده مغز استخوان بالغ در سیستم اهداکننده مغز استخوان در سراسر جهان ثبت شده است، حدود ۳۷۰۰۰ بیمار هنوز در انتظار اهداکننده مشابه هستند (Batta et al. ۲۰۱۶؛ Gratwohl et al. ۲۰۱۵). علاوه بر این، رد پیوند، بیماری پیوند در مقابل میزبان، و بازسازی ضعیف همچنان مسائل جدی برای BMT باقی مانده است که منجر به عوارض و مرگ و میر قابل توجه مرتبط با پیوند می‌شود (Fitzhugh et al. ۲۰۱۷). پس از معرفی ابزارهای نسبتاً آسان و مؤثر ویرایش ژنوم، به ویژه فناوری CRISPR/Cas۹، دانشمندان بر روی درمان‌های مبتنی بر HSC مشتق از بیمار، به‌ویژه برای بیماری‌های تک ژنی مانند SCD تمرکز کرده‌اند. با این حال، روش‌های اصلاح ex vivo برای HSCها به خوبی تثبیت نشده‌اند، و اغلب منجر به کاهش ظرفیت چند خطی در مقایسه با HSCهای تازه می‌شوند، و اثرات اضافی رویکردهای ویرایش هنوز ناشناخته است و نه تنها کارایی، بلکه نگرانی‌های ایمنی را نیز افزایش می‌دهد (Walasek et al. ۲۰۱۲؛ یو و همکاران ۲۰۱۶). در نظریه، سلول‌های بنیادی جنینی[3] با توانایی‌های تکثیر و تمایز نامحدود، امکان بزرگی برای به دست آوردن HSC هایی را فراهم می‌کنند که متعاقباً می‌توانند به گلبول‌های قرمز تمایز یابند. از آنجایی که ملاحظات اخلاقی برای ESCهای مشتق شده از جنین انسان باقی مانده است، کشف سلول‌های بنیادی پرتوان القایی (iPSCs) که با برنامه ریزی مجدد ژنتیکی سلول‌های بدنی به دست می‌آید و از مشکلات اخلاقی مرتبط با ESCها جلوگیری می‌کند، یک جایگزین منطقی ارائه می‌دهد. تنها در چند هفته، به سلول‌های پوست می‌توان ویژگی‌های پرتوانی داد که از آن‌ها می‌توان رده‌های سلولی مختلفی تولید کرد. این فناوری قبلاً برای به دست آوردن بینش در مورد خون‌سازی ارزشمند بوده است و پتانسیل زیادی برای استفاده در درمان قطعی بسیاری از اختلالات مرتبط با خون دارد. به طور خاص، iPSCهای مشتق شده از بیمار را می‌توان

1. LCR

2. SCD

3. ESCs

از نظر ژنتیکی تصحیح و انتخاب کرد تا برای تولید HSCهایی که متعاقباً پیوند می‌شوند یا برای تولید سلول‌های خونی خاص بیمار (به عنوان مثال RBC) استفاده شود.



شکل ۱. تغییر گلوبین‌ها در جنین انسان. اولین تغییر به ترتیب عبارت است از تغییر گلوبین ζ و ε به گلوبین α و γ در طول اولین سه ماه از حاملگی. دومین تغییر که بلافاصله بعد از تولد رخ می‌دهد عبارت است از تغییرگلوبین γ به گلوبین β. برگرفته از (Grosso et al. ۲۰۱۲)

۲,۱ نسل HSC از PSCها

استراتژی‌های مهندسی سلول در حال حاضر برای توسعه پیش‌سازهای خونساز خاص بیمار و روش‌های درمانی مبتنی بر سلول، اختلالات خونی در دسترس هستند. در حالی که پروتکل‌های تمایز سلولی و استراتژی‌های ژنتیکی مبتنی بر مولکولی، تولید پیش‌سازهای خون‌ساز چند توان را امکان‌پذیر کرده‌اند، استخراج دودمان خون‌ساز با قابلیت درمانی هنوز به دلیل عدم عملکرد و مشکلات خود تجدیدی در دراز مدت مشکل‌ساز است. (Row et al. ۲۰۱۶) ایجاد پروتکل‌های کارآمد و درک مکانیسم‌های مولکولی تنظیمی ممکن است ما را از تحقیقات پایه به درمان بالینی سوق دهد تا گلبول‌های قرمز کاملاً متمایز را به دست آوریم که قادر به حمل اکسیژن کافی، حفظ هموستاز، بیان گلوبین بزرگسالان و تحمل ایمنی باشند. در میان سایر سلول‌های خونساز، گلبول‌های قرمز دارای اهمیت درمانی هستند زیرا برای انتقال خون در موقعیت‌های خونریزی شدید، عمل‌های جراحی و بیماری‌های خونی مزمن مانند SCD مورد نیاز هستند. (Ebihara et al. ۲۰۱۲) تحقیقات گسترده‌ای برای تولید تعداد کافی گلبول‌های قرمز از مولدهای مختلف خون انجام شده است، اما کارایی تولید RBC برای اهداف انتقال خون ناامیدکننده است. (Fujimi et al. ۲۰۰۸؛ Neil-dez–Nguyen et al. ۲۰۰۲؛ Giarratana et al. ۲۰۱۱) به این ترتیب، PSCها با قابلیت بسط بی حد و حصر، مزیت بزرگی را ارائه می‌دهند. علاوه بر این، استقرار سیستم‌های ex vivo برای استخراج گلبول‌های قرمز عملکردی از PSCها، که عمدتاً گلوبین بالغ را بیان می‌کنند، یک مدل مناسب برای فعال کردن اریتروپویزیس تکاملی و بررسی ایده‌های بالقوه برای بیماری‌های مرتبط با RBC از جمله SCD قبل از آزمایش‌های حیوانی است.

برای فعال کردن استفاده از گلبول‌های قرمز مشتق‌شده از iPSCها، سیستم تمایز باید اجازه دهد. هسته‌سازی کارآمد و بیان β-گلوبین مشابه گلبول‌های قرمز بالغ، و تعداد زیادی مشتق سلولی (10^{12}) برای یک واحد انتقال خون مورد نیاز است. به خوبی درک شده است که برای داشتن گلبول‌های قرمز عملکردی حامل β گلوبین، HSCهای قطعی باید ابتدا از سلول‌های پرتوان تولید شوند. پیشرفت اخیر در تولید HCS از PSCها به تفصیل گزارش شده است (Ferreira et al. ۲۰۱۸؛ Hwang et al. ۲۰۱۷؛ Wahlster and Daley ۲۰۱۶). بنابراین، تمرکز این بررسی، پیشرفت فعلی برای HSCهای قطعی مشتق شده از PSCها است که می‌توانند به گلبول‌های قرمز عملکردی و بیان کننده گلوبین بالغ تبدیل شوند. iPSCهای انسانی که به صورت زیر جلدی در موش‌های دارای نقص ایمنی[1] کاشته شده‌اند، اثبات اصل را نشان می‌دهد که نشان می‌دهد از نظر تئوری، HSCهای پیوندی عملکردی از PSCها در شرایط آزمایشی مناسب قابل دریافت هستند (Amabile et al. ۲۰۱۳؛ Suzuki et al. ۲۰۱۳). در این مطالعات، سلول‌های $CD34^{+}CD45^{+}$ از تراتوم‌های مبتنی بر iPSC دسته‌بندی شدند و می‌توانستند سیستم خونساز را در

1. NSG

پیوندهای سریالی بازسازی کنند که با HSCهای مشتق از خون بند ناف قابل مقایسه بود. در حالی که آنالیزهای عملکردی بیشتر همراه با ارزیابی‌های مولکولی و ژنتیکی مورد نیاز است، این گزارش‌ها تمرکز بین‌المللی را برای بررسی پارامترهای محیطی حیاتی و اجزای کشت برای تولید HSCs با قابلیت بالینی در شرایط خارج از بدن ضروری می‌سازد. در شرایط ex vivo، سه روش کلی برای به دست آوردن HSCs از PSCها وجود دارد. از طریق (الف) کشت همزمان با سلول‌های استرومایی، (ب) تجمع اجباری سلول‌هایی که اجسام جنینی سه بعدی[1] را تشکیل می‌دهند، و (ج) کشت‌های تک لایه تلقیح شده روی صفحات پوشش‌دار پروتئین ماتریکس خاج سلولی. در سال ۲۰۰۱، برای اولین بار گزارش شد که سلول‌های HSC مانند از سلول‌های بنیادی مزانشیمی که با سلول‌های استرومایی مغز استخوان موش (S17) یا سلول‌های اندوتلیال کیسه زرده (C166) که دارای پتانسیل میلوئیدی، اریتروئیدی و مگاکاریوسیتی بودند، کشت می‌شدند (Kaufman et al. ۲۰۰۱). وودیانیک و همکاران پس از کشت همزمان با OP9 (سلول‌های استرومایی مغز استخوان موش) در کشت تک‌لایه‌ای بدون مکمل‌سازی هیچ فاکتور رشد، یک روش بهبود یافته بیشتر برای استخراج $CD34^+$ از hESCها گزارش کرد (Vodyanik et al. ۲۰۰۵). با این حال، این سلول‌ها فاقد نشانگر پان‌لکوسیت (CD45) بودند، که نشان می‌دهد کشت همزمان با سلول‌های OP9، مراحل اولیه گلبول‌سازی را خلاصه می‌کند. به طور مشابه، کشت همزمان ESCs با سلول‌های استرومایی مشتق از کبد جنین موش (mFLSCs)، سلول‌های $CD34^+ CD45^-$ را تولید کردند که باعث ایجاد گلبول‌های قرمز بتاگلوبین و بیان کننده گلوبین شد. (Ma et al. ۲۰۰۸). در یک مطالعه متفاوت، سلول‌های استرومایی موش به‌دست‌آمده از AGM یا کبد جنینی به‌عنوان سلول‌های تغذیه‌کننده برای ESCهای تمایز یافته خون‌ساز مقایسه شدند. (Ledran et al. ۲۰۰۸) در حالی که کلونی‌های اریتروئید مشتق از CFU-E و BFU-E گلوبین بالغ را بیان نمی‌کنند، بلکه بیشتر گلوبین‌های جنینی و رویانی را بیان می‌کنند، و بازسازی خون ساز محدود در موش‌های NSG در مغز استخوان، سلول‌های مشتق از hESC پس از کشت همزمان با سلول‌های استرومایی مشتق از AGM بالاترین سطوح پیوند خونساز اولیه و ثانویه را برای دوره‌های کوتاه مدت (۱۲ هفته) ارائه کردند. از آنجایی که این روش‌های هم‌کشت به شدت به اجزای مرتبط با سلول و ترشح شده از لایه‌های تغذیه‌کننده وابسته‌اند، از نظر بالینی مرتبط نیست و نتایج به دلیل تفاوت در تعداد زیادی از سلول‌های تغذیه‌کننده و سرم حیوانی که شامل فاکتورهای تمایز و رشد با تعریف ضعیف است، متغیر است.

نیاز به سیستم تمایز قوی بدون تغذیه و بدون سرم تا حدی با ایجاد پروتکل EB که تحت یک مرحله گاسترولاسیون گذرا ex vivo قرار می‌گیرد، که منجر به بیان گذرا ژن‌های مزودرمی و ظهور HSC بعدی می‌شود، برآورده شد. چندین روش برای تشکیل EB از جمله کشت سوسپانس، قطره معلق و تجمع متمرکز با چرخش ارائه شده است. سلول‌های تشکیل‌دهنده EBs تحت تمایز سریع قرار می‌گیرند، بیان مارکرهای پرتوان از جمله Oct۴ و Nanog را کاهش می‌دهند و در نهایت سه لایه زایا را تشکیل می‌دهند. (Poh et al. ۲۰۱۴) برای هدایت تمایز به سمت دودمان خونساز، برخی از فاکتورهای رشد و سیتوکین‌ها از جمله ترومبوپوئیتین[2]، FMS مانند تیروزین کیناز ۳[3]، فاکتور سلول‌های بنیادی[4]، VEGF، BMP۴، فاکتور رشد فیبروبلاست ۲[5] و اینترلوکین‌ها[6] در کشت‌های تمایز گنجانده شده‌اند تا مسیرهای مورد نیاز درگیر در خون‌سازی را فعال کنند. (Gil et al. ۲۰۱۵؛ Smith et al. ۲۰۱۳؛ Vanhee et al. ۲۰۱۵؛ Sweeney et al. ۲۰۱۶) مطالعات ESC موش و انسان نشان داده است که ترکیب صحیح فاکتورهای رشد، فعال کردن یا مهار مسیرهای سیگنالینگ حیاتی و مدت زمان کاربرد برای داشتن فنوتیپ HSC پیوندی طولانی مدت ضروری است. (Carotta et al. ۲۰۰۴؛ Sturgeon et al. ۲۰۱۴) در حالی که تلاش زیادی در مورد این موضوع انجام شده است و پیشرفت‌های تشویقی گزارش شده است، پیوند عمدتاً کوتاه‌مدت یا پیوند با سوگیری رده و پیوند محدود تاکنون برای HSCهای مرتبط بالینی مشتق شده از PSCها گزارش شده است (جدول ۱).

تحقیقات گسترده‌ای برای درک تفاوت در رونوشت بین HSCهای مشتق شده از منابع مختلف از جمله PSCها انجام شد. (McKinney-Freeman et al. ۲۰۱۲؛ Sugimura et al. ۲۰۱۷؛ Sau-vageau et al. ۱۹۹۴؛ Meader et al. ۲۰۱۸؛ Kartalaei et al. ۲۰۱۵) در پرتو این گزارش‌ها، برخی از مسیرهای حیاتی مانند مسیرهای سیگنال‌دهی Notch و Wnt، و بیان ژن‌های حیاتی از جمله ژن‌های خانواده homebox برای مشخصات قطعی HSC مهم هستند (Stur-geon et al. ۲۰۱۴؛ Kyba et al. ۲۰۰۲؛ Burns et al. ۲۰۰۵). در حالی که چندین گزارش، بهبود تولید سلول‌های شبه HSC از PSCها را با برخی روش‌های افزودن ژن نشان داده‌اند، پتانسیل پیوند آنها ناامیدکننده باقی مانده است. با این حال، گروه دیلی اخیراً نشان

1. EBs
2. TPO
3. FLT-3
4. SCF
5. FGF2
6. IL

داده است که انتقال PSCها با ترکیبی از کوکتل فاکتور رونویسی[1] برای تولید HSCهای قطعی که سلول‌های میلوئید، B و T را پیوند می‌زند کافی است. هرچند با مبنای قابل توجه سلول B در گیرندگان موش اولیه و ثانویه، که تا ۱۶ هفته مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت (Sugimura et al. ۲۰۱۷). در حالی که این روش نیاز به فاز میانی ($CD45^+CD43^-$) دارد و به دنبال آن مشخص‌سازی مجدد در HSCهای القا شده، و بیان نابجای چندین فاکتور رونویسی که هنوز از نظر ایمنی مورد تجزیه و تحلیل قرار می‌گیرد، وجود دارد، گزارش‌ها احتمال واقعی مشتق شدن HSC قابل پیوند از iPSCها را نشان می‌دهند. یک سال بعد، تان و همکاران، ارائه کرد که عامل منفرد (MLLAF4) برای تعیین مجدد PSCها به HSCهای پیوندی طولانی مدت کافی است (Tan et al. ۲۰۱۸).

۲,۲ HSCهای مشتق از اندوتلیوم هموژنیک

سلول‌های اندوتلیال و خون برای مدت طولانی به عنوان دو نوع سلول با ویژگی‌های مشترک بسیاری شناخته شده‌اند (Sabin ۱۹۲۰؛ Maximow ۱۹۲۴؛ Crosby et al. ۲۰۰۰). ردیابی اصل و نسب و تحلیلی تصویربرداری با گذشت زمان، نشان داد که برخی از سلول‌های اندوتلیال تخصصی، که به آن «اندوتلیوم هموژنیک» گفته می‌شود، سلول‌های خونی را با انتقال کامل از اندوتلیال به خونساز[2] تولید می‌کنند (Eilken et al. ۲۰۰۹؛ Lacaud and Kouskoff ۲۰۱۷). در حالی که نشان داده شده است که EMPs کیسه زرده، اجداد T و B و HSCها از اندوتلیوم هموژنیک در مطالعات موش نشات می‌گیرند، منشأ خون‌سازی، اولین موج اولیه (E ۷/۵) هنوز ثابت نشده است (Lacaud and Kouskoff ۲۰۱۷). از آنجایی که موج اول قبل از ایجاد شبکه عروقی اتفاق می افتد، بعید است که خونسازی اولیه از طریق اندوتلیوم هموژنیک ایجاد شود. از سوی دیگر، پیش‌سازهای خونساز اولیه نیز نشانگرهای اندوتلیال از جمله TIE۲، VE-cadherin، و CD۳۱ را بیان می‌کنند. (Ema et al. ۲۰۰۶؛ Lancrin et al. ۲۰۰۹؛ Fraser et al. ۲۰۰۲) نشان می‌دهد که رابطه نزدیکی بین رده‌های اندوتلیال و خونساز در تمام مراحل خونسازی وجود دارد. بنابراین، اندوتلیوم هموژنیک در تلاش برای داشتن مدل مناسب برای خونسازی و استخراج HSCهای قطعی با سیستم‌های کشت خارج از بدن سازگار شده است. گروه کلر با گزارش اینکه EBهای تحریک شده با BMP۴ می‌توانند باعث ایجاد اجداد اندوتلیال گذرا شوند، حضور این پیش‌سازهای مشترک را نشان دادند. تمایز به سلول‌های اریتروئیدی بدوی که گلوبین‌های ε و γ، ماکروفاژها و سلول‌های اندوتلیال را بیان می‌کنند (Kennedy et al. ۲۰۰۷). بعداً ارائه شد که استفاده از سیگنال‌دهی Wnt متعارف می‌تواند خون‌سازی قطعی را از طریق مرحله اندوتلیوم هموژنیک فعال کند، همانطور که با بیان گاما گلوبین در گلبول‌های قرمز، و توانایی تمایز لنفوئید T سلول‌های شبه HSC مشتق شده از PSCها مشهود است (Stur-geon et al. ۲۰۱۴). پتانسیل لنفوئید T، پیش‌ساز یکی از پارامترهای مورد استفاده برای ارزیابی خونسازی قطعی است (Kennedy et al. ۲۰۱۲). با این حال، بیان β-گلوبین در این گلبول‌های قرمز و توانایی پیوند سلول‌های شبه HSC در موش‌های NSG گزارش نشد. نشان داده شده است که این پیش‌سازهای اندوتلیال به جمعیت خاصی محدود می‌شوند ($CD34^+$ $CD73^-$ $CD184^-$ $DLL4^-$) که اجداد خونساز چندتوان و متمایز از پیش‌سازهای اندوتلیوم عروقی تولید می‌کنند (Ditadi et al. ۲۰۱۵). علاوه بر این، این گزارش نشان داد که فعال‌سازی EHT به شدت به سیگنالینگ Notch وابسته است. همان گروه همچنین بیان قوی ژن CDX۴ را در مزودرم خونساز قطعی فعال شده با Wnt ارائه کرد که نقش حیاتی شبکه تنظیم کننده رونویسی را در HSC اختصاصی نشان داد (Creamer et al. ۲۰۱۷). این گزارش‌ها، با این حال، هیچ گونه توانایی پیوند سلول‌های HSC مانند مشتق شده از اندوتلیوم هموژنیک را نشان ندادند. همانطور که در بالا ذکر شد، یک مطالعه اخیر گزارش داد که پیش‌سازهای مشتق از اندوتلیوم هموژنیک که با ۷ فاکتور رونویسی تبدیل شده است می‌توانند HSCهای پیوندی اولیه و ثانویه تولید کنند (Sugimura et al. ۲۰۱۷). در مجموع، در حالی که مکانیسم‌های مولکولی کامل خون‌سازی به طور کامل مشخص نشده است، آزمایش‌های برون تنی و درون تنی نشان می‌دهند که ما به فعال‌سازی یا مهار مسیرهای سیگنالینگ حیاتی و بیان ژن‌های فاکتور رونویسی برای داشتن HSCهای ایمن، کاربردی و قابل پیوند نیاز داریم. محیط بالینی پس از ایجاد سیستم تمایز، دودمان سلولی قطعی مانند گلبول‌های قرمز برای اهداف بالینی تولید می‌شود.

1. ERG, HOXA5, HOXA9, HOXA10, LCOR, RUNX1 and SPI1
2. EHT

منبع	پیوند	سطح بیان گلوبین	روش تمایز	کاربرد
Amabile et al. (۲۰۱۳؛ Suzuki et al. (۲۰۱۳	طولانی مدت با سلول‌های B و T ومیلوئید ها	گلوبین‌های δ ,β ,ζ ,γ ,ε در کلونی‌های CFU-E مشتق از PSCها که تراتوماها را خارج می‌کنند.	تزریق ESCها یا IPSCها به موش با یا بدون سلول‌های تغذیه کننده OP۹ و سایتوکاین ها	تشکیل تراتوم به صورت in vivo
Ledran et al. ۲۰۰۸	کوتاه مدت با میلوئید و لنفوئید (۱۲ هفته)	گلوبین‌های ζ ,γ ,ε, در کلونی‌های CFU-E و BFU-E	تمایز Ipscها با سلول‌های استرومال مشتق از ناحیه مزونفورس غدد جنسی آئورت (AGM)	تمایز مستقیم با سلول‌های تمایز کننده
Gori et al. ۲۰۱۵	طولانی مدت با میلوئید، لنفوئید و اریتروئید	عمدتاً گلوبین β و کمتر گلوبین γ در کلونی‌های CFU-E مشتق شده‌اند از پیوند سلول‌های پیش‌ساز پرتوان	تشکیل جسم امبریئود برای استخراج HSC. سلول‌های مرتب شده همزمان با سلول‌های اندوتلیال و سایتوکاین‌های هماتوپویتیک کشت داده شدند	کشت همزمان با سلول‌های اندوتلیال از hESCها و iPSCهای میمون
Doulatov et al. ۲۰۱۳	کوتاه مدت با اریتروئید – میلوئید (۴ تا ۸ هفته)	بیشتر ε و γ، کمتر یا حتی نبود گلوبین β در ex vivo مشتق از سلول‌ها. هموگلوبین‌ها بعد از پیوند به NSG موش تغییر می‌کنند. (گلوبین‌های γ و β)	اجسام امبریئود	بیان خاج از رحم HOXA۹، SOX۴، RORA، ERG و MYB در iPSCها
Sugimura et al. ۲۰۱۷	طولانی مدت با سلول‌های B و T و میلوئید	گلوبین‌های γ و β در پیوند با سلول‌های اریتروئید انسان با هسته‌زدایی محدود	تعیین HSCها از iP-SCها از طریق اندوتلیوم هموژنیک	بیان خاج رحم از ERG، HOXA۵، HOXA۹، HOXA۱۰، LCOR، SPI۱ (II) و RUNX۱ در سلول‌های اندوتلیوم هموژنیک مشتق از IPSها
Tan et al. ۲۰۱۸	طولانی مدت با سلول‌های B و T، اریتروئید و میلوئید	NA	تمایز تک لایه	بیان خاج رحم از MLL-AF۴ در IPSCها

۲,۳ گلبول‌های قرمز مشتق از PSC ها

تولیدگلبول‌های قرمز بالغ از PCSها باعث تولید بی حد و حصر RBC برای اهداف انتقال خون و همچنین ایجاد مدل‌های مناسب برای بیماری‌ها به عنوان مثال SCD، غربالگری دارو و فعال کردن آبشار جنینی اریتروپوئیزیس می‌شود. پیشنهاد شده است که iPSC ۱۵۰