

فهرست

پیشگفتار مترجمین.....	۷
فصل ۱: بررسی تنوع و میزان هتروژنیسیته در کاردیومیوسیت‌های مشتق از سلول‌های بنیادی پرتوان القایی.....	۹
فصل ۲: برنامه‌ریزی مجدد رده‌ای در CNS به‌طور مستقیم.....	۴۱
فصل ۳: سلول‌های بنیادی پرتوان القایی در پزشکی ترمیمی: کنترل کیفی بر پایه ارزیابی ترکیب لیپیدی.....	۶۱
فصل ۴: بافت چربی سلول‌زدایی شده: ترکیبات بیوشیمیایی، آنالیز درون‌تنی و کاربردهای بالینی بالقوه.....	۷۱
فصل ۵: مفهوم سلول‌زدایی در پزشکی ترمیمی.....	۸۷
فصل ۶: سلول‌های بنیادی/ استرومال مزانشیمی مشتق از پوشینه‌ی مفصلی (سینوویوم) و مسئولیت آن‌ها در بازسازی غضروف.....	۱۰۱
فصل ۷: سلول‌های بنیادی پوستی، ریزمحیط آن‌ها و رویکرد مهندسی بافت در بازسازی پوست.....	۱۲۵
فصل ۸: تنظیم عصبی ریزمحیط مغز استخوان.....	۱۴۷
فصل ۹: ژن‌های همئوباکس و پروتئین‌های همودومین: بینش‌های جدید در توسعه، تخریب و بازسازی کاردیاک قلب.....	۱۷۷
فصل ۱۰: تولید ارگانوئیدهای پانکراس مشتق شده از سلول‌های بنیادی انسانی برای پزشکی بازساختی.....	۲۰۵
واژه‌یاب.....	۲۵۳

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 آنجایی که 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، بطوری که 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.

بهار ۱۴۰۳

فصل ۱

بررسی تنوع و میزان هتروژنیسیته در کاردیومیوسیت های مشتق از سلول های بنیادی پرتوان القایی

Sherri M. Biendarra-Tiegs, Frank J. Secreto, and Timothy J. Nelson

APD (action potential duration)

رویه تولید خوب فعلی

cGMP (current Good Manufacturing Practice)

تنوع شماره کپی

CNV (copy number variation)

بیان ژن متفاوت

DEG (differentially expressed gene)

بدن جنین

EB (embryoid body)

ماتریکس خارج سلولی

ECM (extracellular matrix)

سنجش حساسیت اتوپوزید

ESA (etoposide sensitivity assay)

سلول های بنیادی جنینی

ESC (embryonic stem cell)

کاردیومیوسیت مشتق شده از سلول های بنیادی جنینی

ESCCM (embryonic stem cell-derived cardiomyocyte)

مرتب سازی سلولی فعال شده با فلورسانس

FACS (fluorescence-activated cell sorting)

سلول های بنیادی پرتوان القا شده توسط

iPSC (induced pluripotent stem cell)

کاردیومیوسیت مشتق شده از سلول های بنیادی پرتوان القایی

CM- iPSC (induced pluripotent stem cell-derived

cardiomyocyte)

چکیده

سلول های پرتوان القایی^۱ (iPSCs) در زمینه مدل سازی بیماری، تحقیقات پایه، ابداع دارو و پزشکی ترمیمی امیدبخش هستند. توانایی iPSCها در تولید انواع سلول های دور از دسترس مانند کاردیومیوسیت ها^۲ - که از نظر ژنتیکی با یک بیمار یا هر فرد موردنظر دیگری سازگار باشد - ارزش بالای آنها را نشان می دهد. با این حال، مشکل جدی پلتفرم iPSC، تنوع بالا و قابل مشاهده در محصولات تمایزی آن است. این تفاوت ها در جنبه های ژنتیکی، اپی ژنتیکی و رونویسی، سیگنالینگ سلولی، انواع سلول های تولید شده در تمایز قلبی و عملکرد کاردیومیوسیت دیده می شود. این ویژگی ها ممکن است ناشی از سلول سوماتیک منشأ و یا شرایط محیطی مربوط به استخراج و کار با این سلول ها باشد. شناخت عوامل ایجاد تنوع همراه با تعیین میزان اثرگذاری هر عامل، برای پیشرفت تکنولوژی های مبتنی بر iPSC ضروری است.

کلمات کلیدی

کاردیومیوسیت ها، ریز محیط سلولی، تمایز، سلول های بنیادی پرتوان القایی، تنوع فنوتیپی، هتروژنیسیته در سلول بنیادی

اختصارات

پتانسیل عمل

AP (action potential)

مدت زمان پتانسیل عمل

1. Induced Pluripotent Stem Cell

2. Cardiomyocytes

DNA میتوکندری

mtDNA (mitochondrial DNA)

تغییرات تک نوکلئوتیدی

SNV (single nucleotide variation)

غیر فعال سازی کروموزوم

X: XCI (X-chromosome inactivation)

۱ مقدمه

از آغاز کشف سلول‌های بنیادی پرتوان القایی انسانی (iPSCs) در سال ۲۰۰۷ (Takahashi et al. 2007; Yu et al. 2007)، این تکنولوژی انقلابی، در حوزه‌های مختلف شامل مدل سازی بیماری‌ها، کشف دارو و تست سمیت و درمان‌های مبتنی بر سلول (Musunuru et al. 2017; Yoshida and Yamanaka et al. 2018) استفاده شده است. قدرت بالای این پلتفرم به توانایی آن در تولید iPSC از افرادی با زمینه‌های ژنتیکی منحصر به فرد است که متعاقباً تمایز آن‌ها به انواع بی‌شماری از سلول‌ها از جمله سلول‌هایی که دسترسی به آن‌ها به روش‌های دیگر دشوار است؛ مانند کاردیومیوسیت‌ها انجام می‌شود. درحقیقت این توانایی ارتباط تنگاتنگی با پزشکی شخصی شامل درمان‌های مبتنی بر سلول اتولوگ دارد. به علاوه توانایی دستیابی به تنوع موجود در جمعیت انسانی و مطالعه ارتباطات ژنتیکی-فنوتیپی، منجر به استفاده از iPSC‌ها در طیف وسیعی از بیماری‌ها شده است. به عنوان مثال کاردیومیوسیت‌های مشتق از iPSC برای مدل سازی بیماری‌هایی مانند سندروم QT طولانی^۱ (Moretti et al. 2010)، سایر کانالوپاتی‌ها^۲ مانند سندروم تیموتی^۳ (Yazawa et al. 2011)، کاردیومیوپاتی‌ها (Wyles et al. 2016)، آریتمی تاکی کاردی بطنی^۴ (Jung et al. 2012) بیماری‌های میتوکندریایی شامل سندروم بارت^۵ (Wang et al. 2014) و حتی بیماری‌های ساختاری قلب (Hrstka et al. 2017) مورد استفاده قرار گرفته‌اند.

با این وجود، درحالی که تغییرات طبیعی به دست آمده از iPSC‌ها و دودمان کاردیومیوسیت‌های تمایز یافته ارزش بالایی دارد؛ از طرفی هتروژنیسیته و تنوع در این جمعیت‌های سلولی ممکن است مشکل آفرین باشد. تولید iPSC-CMs به شیوه‌ای قابل اطمینان و پایدار^۶ سودمند خواهد بود. امر مهم در مدل سازی بیماری، توانایی درک ارتباط بین ژنوتیپ و فنوتیپ، درغیاب اثر متغیرهای

منحرف کننده نتایج است. به علاوه در مدل سازی بیماری، غالباً داشتن سلول‌هایی بسیار شبیه به یک زیرگروه خاص از کاردیومیوسیت‌ها مثلاً سلول‌های شبیه به کاردیومیوسیت‌های موجود در حفرات دهلیز یا بطن قلب، مطلوب است (Marczenke et al. 2017). این مورد همچنین برای تکرارپذیر بودن نتایج به عنوان نگرانی اصلی در تحقیقات علمی، ضروری است (Osterloh and Mulelane 2018). درمورد کاربردهای مرتبط با ابداع دارو، کار با iPSC-CM‌هایی در مراحل مشخصی از تکوین که بتوانند عملکردی شبیه به بافت قلب انسان داشته باشند؛ مهم است. نوع زیرگروه کاردیومیوسیت نیز در این شرایط به نوعی نگرانی ایجاد می‌کند (Denning et al. 2016). در مقوله‌ی درمان‌های سلولی، کاهش هر نوع نگرانی مربوط به ایمنی مانند سلول‌های غیرعادی از نظر ژنتیکی، امری حیاتی است (Merkle et al. 2017). امکان ایجاد آریتمی نیز به دلیل وجود ترکیبی از انواع زیرگروه‌های کاردیومیوسیت، می‌تواند نگران کننده باشد (Liu et al. 2018).

در این فصل، مروری بر علل و انواع تغییرات و هتروژنیسیته در سلول‌های بنیادی پرتوان القایی و کاردیومیوسیت‌های تمایز یافته خواهیم داشت. همچنین به رویکردهای ارائه شده برای کمک به حفظ تغییرات ژنتیکی در عین افزایش پایداری می‌پردازیم. درحالی که تمرکزمان بر iPSC‌ها خواهد بود؛ بیشتر اطلاعات به دست آمده از سلول‌های بنیادی جنینی (ESCs)^۷ یا حتی سلول‌های بنیادی پرتوان موشی را هم می‌توانیم در پلتفرم iPSC-CM به کار گیریم. نهایتاً، تعیین میزان مجاز یا غیرمجاز هتروژنیسیته و تغییرات در یک کاربرد خاص و مناسب سازی تولید سلول یا طراحی پژوهشی متناسب با آن کاربرد خاص، هدف ما خواهد بود.

۲ تنوع ذاتی و اکتسابی در رده‌های سلول‌های بنیادی پرتوان

۲-۱ ناهنجاری‌های ژنتیکی و اپی ژنتیکی

یکی از دلایل احتمالی تغییرات در رده‌های سلولی iPSC، ناهنجاری‌ها در سطوح ژنتیکی و اپی ژنتیکی است. این تغییرات، بین رده‌های مختلف iPSC‌ها، پاساژهای مختلف از رده‌های iPSC مشابه یا حتی زیرجمعیت‌های^۸ درون یک کشت iPSC کشف شده است. آنیوپلوئیدی^۹، بازآرایی کروموزومی^{۱۰}، تغییر تعداد نسخه‌های زیرکروموزومی (CNV)^{۱۱}، تغییر تک نوکلئوتید (SNV)^{۱۲}، تغییر

7. embryonic stem cells (ESCs)

8. subpopulations

9. aneuploidy

10. chromosomal rearrangement

11. sub-chromosomal copy number variation (CNV)

12. single nucleotide variation (SNV)

1. long QT syndrome

2. channelopathies

3. Timothy syndrome

4. ventricular tachycardia

5. Barth syndrome

6. reliable and consistent

خاص نشان دادند (Fazeliet al. 2011).

CNVها همچنین در سلول‌های بنیادی پرتوان مشاهده شده است. برای مثال، در یک مطالعه از هیبریدیزاسیون ژنومی مقایسه‌ای مبتنی بر آرایه تک‌سلولی^۵ برای تشخیص آن دسته از سلول‌های سوماتیک و ESC دارای انواعی از ناهنجاری‌های کروموزومی در ابعاد مگاباز استفاده شد. نویسندگان چنگال همانندسازی بریده شده را یافتند که فروریخته بود و همانندسازی القاشده بر اثر برش به‌عنوان یک عامل بالقوه مشخص شد که احتمالاً نتیجه‌ی شرایط کشت غیربهینه بوده است (Jacobs et al. 2014). آنالیز ژنومی ۵۸ رده‌ی iPSC از ۱۰ آزمایشگاه، CNVهایی را نشان داد که ویژه‌ی فرد دهنده بودند و انواع دیگر آن‌ها بین رده‌های مختلف از یک فرد متفاوت بود. وجود چند لوکوس ژنی که غالباً تحت تأثیر قرار گرفته بودند، گویای این مطلب است که مبنای این تغییرات، فرایند برنامه‌ریزی مجدد است. در برخی موارد، حذف سرکوبگرهای توموری یا مضاعف شدن ژن‌های مرتبط با رشد، گویای مزیت زنده‌مانی یا رشد است (Salomonis et al. 2016). براساس نتیجه‌گیری مشابه حاصل از مطالعه‌ای دیگر، CNVها در فرایند برنامه‌ریزی مجدد تولید می‌شوند و مزیت انتخابی ایجاد می‌کنند؛ درعین حال CNVهای بیشتری در پاساژهای اولیه iPSCها یافت شده است (Hussein et al. 2011). براساس ارزیابی ۷۱۱ رده‌ی سلولی از ۳۰۱ فرد سالم، سطوح پایین‌تری از خطاهای ژنتیکی^۶ نسبت به نتایج مطالعات قبلی گزارش شد. این گزارش احتمالاً به دلیل دسترسی نویسندگان به نمونه‌های مرجع همسان با دهنده^۷ بوده؛ بنابراین آن‌ها قادر به شناسایی تغییرات تعداد کپی‌ها در دودمان زایشی^۸ بوده‌اند. انحرافات یافت شده در رده‌های iPSC، منحصر به فرد بود؛ اما در رده‌های سلولی مختلف از یک فرد مشابه دیده شد. تعداد این تغییرات ارتباطی با شماره‌ی پاساژ، سن دهنده، جنس یا نتایج حاصل از ارزیابی کنترل کیفی PluriTest نداشت (Kilpinen et al. 2017). شیوع SNVها نیز مورد ارزیابی قرار گرفته است. براساس نتیجه‌ی یک مطالعه، در هر رده‌ی iPSC مورد آزمایش بین ۱۰۵۸ تا ۱۸۰۸ SNV هتروزیگوت یافت شد که ۵۰٪ آن‌ها از نوع تغییرات خاموش^۹ بود. از آن‌جا که SNVها بین رده‌های iPSC مربوط به یک فرد دهنده مشترک نبود؛ ناهنجاری‌ها احتمالاً نتیجه‌ی فرایند برنامه‌ریزی مجدد بوده‌اند (Cheng et al. 2012).

تفاوت‌های اپی‌ژنتیکی بین رده‌های iPSC شامل سطوح

مربوط به غیرفعال شدن کروموزوم ایکس^۱ و متیلاسیون نابه‌جا DNA انواع این تغییرات هستند. هریک از این تغییرات می‌تواند منجر به خصوصیات سلولی غیرقابل پیش‌بینی نظیر اکتساب یا ناپدید شدن فنوتیپ‌های مرتبط با بیماری شود (Liang and Zhang 2013; Nguyen et al. 2013).

مطالعات انجام شده در مقیاس وسیع، دید بیشتری درباره‌ی فراوانی و طبیعت خاص این ناهنجاری‌ها فراهم آورده است. به‌عنوان مثال، آنالیز کاریوتیپ بالغ بر ۱۷۰۰ کشت iPSC و ESC از ۹۷ محقق در ۲۹ آزمایشگاه برای هر دو نوع سلول حدود ۱۲٪ از کشت‌ها را غیرطبیعی نشان داد. از نظر نوع ناهنجاری، بین iPSCها و ESCها شباهت‌ها و تفاوت‌هایی وجود داشت. تریزومی ۱۲ در هر دو نوع سلول غالب بود؛ اکتساب جزئی کروموزوم ۱۲^۳ و تریزومی ۲۰q نیز در هر دو دیده شد؛ تریزومی ۸ در iPSCها نسبت به ESCها رایج‌تر بود؛ وجود کروموزوم X اضافه در ESCهای ماده رایج‌تر بود و تریزومی ۱۷ تنها در ESCها دیده شد (Taapken et al. 2011). در مطالعه‌ی دیگری ۱۲ تا از ۳۸ رده‌ی سلولی ESC (۳۲٪) و ۱۳ تا از ۶۶ رده‌ی سلولی iPSC (۲۰٪) ناهنجاری داشتند که ۶ رده‌ی سلولی iPSC دارای تریزومی کامل ۹،۳،۱ یا ۱۲ بودند (Mayshar et al. 2010). همچنین دیده شد که نرخ آنیوپلوئیدی با افزایش پاساژها بالا رفت (Mayshar et al. 2010). پیشنهاد شده است که ناهنجاری‌های کاریوتیپیک احتمالاً ناشی از سازگاری با محیط کشت هستند یا در سلول‌های مادری وجود داشته‌اند یا در فرایند برنامه‌ریزی مجدد^۴ حاصل فشار انتخابی هستند (Mayshar et al. 2010). براساس مطالعات انجام شده، ناهنجاری‌های کروموزومی در برخی موارد در سلول‌های سوماتیک اولیه وجود دارند (Vitale et al. 2012). برخی از مطالعات نشان داده‌اند که بعضی روش‌های پاساژ دادن می‌توانند سبب ایجاد ناهنجاری‌های کروموزومی شوند (Mayshar et al. 2010; Taapken et al. 2011). درحالی‌که در برخی دیگر از مطالعات، محققان نشان داده‌اند که روش برنامه‌ریزی مجدد و کشت سوبسترا نقش قابل‌توجهی در ایجاد ناهنجاری نداشتند (Mitalipova et al. 2005). همچنین، ناهنجاری‌های کاریوتیپیک ممکن است عواقب عملکردی همراه داشته باشد. به‌طور مثال، رده‌های ESC طبیعی و غیرطبیعی با تمایز خودبه‌خودی، تفاوت‌هایی در بیان ژن‌های مرتبط با تمایز و خصوصیات متفاوتی را در دودمان‌هایی

5. single-cell array-based comparative genomic hybridization
6. genetic aberrations
7. donor-matched reference samples
8. germline
9. synonymous changes

1. Variable X-chromosome inactivation
2. Trisomy 12
3. partial gain of chromosome 12
4. reprogramming

پرتوانی و وابسته به دودمان^۵ در ESCها، پتانسیل تکوینی را به سمت دودمان‌های مشخصی می‌برد (Hong et al. 2011). وضعیت کروموزوم X در iPSCها و ESCهای ماده همچنین به‌طور گسترده برای تعیین مشخصات این سلول‌ها کاربرد دارد (Wutz 2012). این مورد ابتدا توسط Silva و همکارانش توصیف شد. آن‌ها نشان دادند ESCها در زمان کشت تمایل به ازدست‌دادن بیان RNA XIST دارند که سبب ایجاد سه کلاس سلولی متفاوت می‌شود. کلاس I، پیش از غیرفعال‌شدن کروموزوم^۶ (XCI) X است که در آن سلول‌ها پس از تمایز، توانایی بازگردانی XCI را دارند. در سلول‌های کلاس II، سلول‌های بیشتری XIST مثبت و در وضعیت XCI هستند. کلاس III سلول‌هایی هستند که بیان XIST را ازدست‌داده‌اند اما همچنان یک کروموزوم X غیرفعال شده دارند که پس از تمایز دوباره فعال نمی‌شود. برخی از این رده‌های کلاس III تمایز خودبه‌خودی ضعیفی در اجسام شبه جنینی (EBs)^۷ نشان می‌دهند (Silva et al. 2008). آنالیز ده‌ها رده‌ی iPSC، تغییرات قابل‌توجهی را در بیان XIST و در وضعیت H3K27me3 و XCI نشان داده است (Geens et al. 2016; Mayshar et al. 2010; Salomonis et al. 2016). کلون‌های iPSC مشتق از تک سلول مربوط به یک فرد دهنده، سطوح مختلفی از XCI را دقیقاً پس از جداسازی کلونال نشان می‌دهند که در هر کلنی دو نوع سلول پیش‌پس از XCI وجود دارد (Andoh-Noda et al. 2017). در سایر مطالعات، به‌صورت مشابه به ترکیبی از سلول‌ها با وضعیت XCI متفاوت در پاساژ مشابه یا حتی در کلنی مشابه اشاره شده است (Geens et al. 2016; Tanasijevic et al. 2009). در برخی موارد، XCI با گذر زمان و با تکرار پاساژ بدون فعال‌سازی مجدد به‌دست می‌آید (Andoh-Noda et al. 2017). در موارد دیگر اضمحلال XCI در محیط به‌صورت پایدار و بدون بازیابی با تمایز یا برنامه‌ریزی مجدد، گزارش شده است (Geens et al. 2016; Mekhoubad et al. 2012). در یکی از این مطالعات که در آن چند فعال‌سازی مجدد کروموزوم X گزارش شده، افزوده‌اند که کلاسترهایی از ژن‌ها در نواحی کروموزومی معینی زودتر از نقاط دیگر مجدداً فعال شده‌اند (DeBoever et al. 2017). در مطالعه‌ای دیگر همراه با گزارش فعال‌سازی کروموزوم‌های X در برخی iPSCها پس از برنامه‌ریزی مجدد، به هیچ ارتباطی بین وضعیت XCI با شماره‌ی پاساژ، شرایط کشت یا روش برنامه‌ریزی مجدد اشاره‌ای نشده است (Bruck and Benvenisty 2011). وضعیت کروموزوم

متفاوتی از متیلاسیون نابه‌جای DNA نیز بیان شده است. به‌طور مثال، آنالیز ژنومی ۵۸ رده‌ی iPSC از ۱۰ آزمایشگاه نشان داده درحالی‌که ESCها و iPSCها عموماً در سطح بیان سراسری ژن^۱ غیرقابل تمایز هستند؛ در پروفایل متیلاسیون آن‌ها تفاوت‌های قابل‌توجهی وجود دارد (Salomonis et al. 2016). در iPSCهای مشتق از منابع سلولی متفاوت نیز (فیبروبلاست‌های پوستی نوزادی، فیبروبلاست‌های پوستی بالغ و سلول‌های CD34⁺ مشتق از سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی) حاصل از تکنولوژی‌های مختلف برنامه‌ریزی مجدد، تفاوت‌هایی در متیلاسیون DNA یافت شده است. این هتروژنیسیته، پس از کشت طولانی کاهش می‌یابد و به سطوح متیلاسیون DNA در ESCها شباهت پیدا می‌کند (Tesarova et al. 2016). گروه دیگری عکس این نتایج را به دست آوردند. آن‌ها دریافتند که الگوهای اپی‌ژنتیکی رده‌های iPSC متفاوت، صرف‌نظر از منبع سلولی، مشابه یکدیگر و ESCها است اگرچه در این مورد برای همه‌ی رده‌های iPSC از یک نوع رویکرد برنامه‌ریزی مجدد استفاده شده است. در پاساژهای اولیه، چند هاپیر متیلاسیون نابه‌جا و تصادفی مشاهده شد که در پاساژهای بعدی فراوانی آن کم شد (Nishino and Umezawa 2016). پروفایل رونویسی ۳۱۷ رده‌ی iPSC انسانی برگرفته از ۱۰۱ نفر، در دو هدف کمپلکس سرکوبگر پلی‌کامب^۲ (PRC2) و H3K27me3 تغییرات رونویسی را آشکار ساخت که به نظر می‌رسید مستقل از زمینه‌ی ژنتیکی باشد و فرایند برنامه‌ریزی مجدد می‌تواند علت آن باشد. در همین مطالعه، برخی ژن‌ها عدم تعادل بیان آلی را نشان دادند درحالی‌که ژن‌های دیگر بیان دوالی داشتند. این الگوها در برخی موارد در یک فرد، ثابت اما بین افراد مختلف متفاوت بود (Carcamo-Orive et al. 2017). اخیراً ترکیبی از ژن‌ها با بیان تک‌آلی یا دوالی در iPSCها (Pick et al. 2009) و همچنین ESCها دیده شده است (Kim et al. 2007). براساس مطالعه‌ای، در برخی رده‌های iPSC که در محیط کشت پایدار بودند؛ کاهش فراوانی در حذف نقش‌گذاری^۳ گزارش شده است (Hiura et al. 2013). از آنجاکه نشان داده‌اند آشکال اپی‌ژنتیکی را می‌توان برای تعیین رده‌های iPSC دارای ظرفیت تمایزی و شاید حتی ظرفیت بلوغ^۴ مشخص مورد استفاده قرار داد؛ این تفاوت‌های اپی‌ژنتیکی، می‌توانند ارتباطات عملکردی داشته باشند (Nishizawa et al. 2016). برای مثال، تغییرات هیستونی H3K27me3 و H3K4me3 در ژن‌های

5. lineage-associated

6. pre X-chromosome inactivation

7. embryoid bodies (EBs)

1. Global gene expression

2. Polycomb repressive complex

3. Low frequency loss of imprinting

4. maturation capacity

مربوط به دهنده نیز در درجه اول به دلیل تفاوت ژنتیکی بین افراد به وجود آمده است (Kilpinen et al. 2017).

براساس دستاوردهای مشابه از سایر مطالعات، تفاوت‌های بین فردی عاملی اساسی در بروز تنوع بین رده‌های سلولی مانند تنوع در سطوح برش و نقش‌بندی mRNA^۴ است (Rouhani et al. 2014). برای مثال، ۳ کلون از iPSC‌های مربوط به یک فرد با تهیه پروفایل رونویسی و آنالیز مسیر عملکردی^۵ قابل تشخیص نبود و با ESC‌ها و iPSC‌های دهنندگان مختلف متمایز بود. تفاوت‌های موجود بین دهنندگان، پس از تمایز این سلول‌ها به سه لایه‌ی جنینی در اجسام شبه جنینی^۶ حفظ شد (Schuster et al. 2015). رده‌های iPSC و ESC‌های ایزوژنیک در هر دو حالت تمایز یافته و فاقد تمایز، بیان ژنی متفاوت و قابل توجهی نشان ندادند و در پروفایل‌های متیلاسیون آن‌ها تفاوت اندکی در حالت تمایز نیافته وجود داشت (Mallon et al. 2014).

از طرف دیگر، نقش حافظه‌ی اپی‌ژنتیکی مشتق از سلول سوماتیکی منشأ نیز در ایجاد تنوع بین رده‌های سلولی بسیار بحث‌برانگیز بوده است. مشخص است که سلول‌های سوماتیک متفاوت یا حتی یک نوع سلول در محل‌های مختلف، پروفایل‌های اپی‌ژنتیکی متفاوتی دارند. برای مثال، داده‌ی برگرفته از متیلاسیون DNA سراسر ژنومی و داده‌ی ترنسکریپتوم بر جفت‌های همسان از فیبروبلاست‌های سخت‌شامه و پوست سر، حافظه‌ی اپی‌ژنتیکی قوی را براساس محل نمونه‌گیری نشان داد. تنوع اپی‌ژنتیکی بیشتری به‌خصوص در سلول‌های مشتق از پوست سر با افزایش سن مشاهده شد (Ivanov et al. 2016). با این وجود، همچنین مشخص شده است که حافظه‌ی اپی‌ژنتیکی لزوماً عامل اصلی دخیل در تنوع رونویسی نیست (DeBoever et al. 2017; Rouhani et al. 2014). براساس مطالعه‌ی، محققان iPSC‌های جفت شده از فیبروبلاست‌ها و خون چند دهنده را مورد بررسی قرار دادند و مشاهده کردند که رده‌های مربوط به دهنده‌ی یکسان به‌شدت از نظر رونویسی و اپی‌ژنتیکی شبیه هستند؛ اما دهنندگان مختلف دارای الگوهای ترنسکریپتوم و متیلاسیون مخصوص به خود بودند که با ظرفیت‌های خاص تمایزی در آن‌ها رابطه داشت (Kytala et al. 2016). مشابه آن، در مطالعه‌ی دیگر بین iPSC‌های مشتق از رده‌های لیمفوبلاستوئید و فیبروبلاست، تفاوت اندکی در متیلاسیون DNA یا الگوهای بیان ژن شناسایی شد. باز هم مشخص شد که تنوع ژنتیکی بزرگ‌ترین عامل تفاوت بین رده‌های سلولی مختلف

X می‌تواند برای این iPSC‌ها پیامدهای عملکردی داشته باشد. فقدان XIST در iPSC‌های ماده به تنظیم افزایشی انکوزن‌های وابسته به X، تنظیم کاهش سرکوبگرهای توموری، افزایش نرخ رشد در محیط *in vitro* و تمایز ضعیف‌تر در ترانزومها مربوط است (Anguera et al. 2012). همچنین در رده‌های iPSC ماده با بیان متفاوت XIST و وضعیت XCI متفاوت، ژن‌های تکوینی به‌صورت متفاوتی متیله شده‌اند (Salomonis et al. 2016).

۲-۲ سهم سلول‌های مبدأ در خواص iPSC

چگونگی بروز تنوع ژنتیکی، اپی‌ژنتیکی و رونویسی بین رده‌های مختلف iPSC سؤال اساسی و بی‌پاسخ در این حوزه است؛ با این وجود نتیجه‌ی تعدادی از مطالعات به روشن شدن آن کمک کرده است. براساس پروفایل رونویسی مربوط به ۳۱۷ رده‌ی iPSC انسانی از ۱۰۱ نفر، ۵۰٪ تنوع در بیان محتوای ژنوم را می‌توان با تنوع بین افراد توجیه کرد (Carcamo-Orive et al. 2017). حتی شناسایی محل بیان صفت به‌صورت کمی مربوط به آن تغییر ایجاد شده امکان‌پذیر است که در بررسی تنوع حاصل از مطالعات هم‌خوانی سراسر ژنوم^۱ راه‌گشا است (Carcamo-Orive et al. 2017; DeBoever et al. 2017). سایر متغیرها نظیر سن دهنده، شاخص توده بدن، جنس، نیا، متخصص انجام و سری^۲ برنامه‌ریزی مجدد، متخصص آماده‌سازی RNA، حجم ویروس Sendai^۳ و منبع سلولی با برنامه‌ریزی مجدد تنها بر تنوع بیانی تعداد کمی از ژن‌ها اثرگذار بودند. با این حال، بین رده‌های iPSC مشتق از یک فرد تفاوت‌هایی وجود داشت که هدف‌های ژنی Polycomb نقش‌ی اساسی در تنوع غیر ژنتیکی درون فردی و بین فردی ایفا می‌کردند (Carcamo-Orive et al. 2017). در ۱۰ آزمایشگاه روی ۵۸ رده‌ی سلولی آنالیز ژنومی انجام گرفت که فرد دهنده، جنس، تکنولوژی برنامه‌ریزی مجدد و آزمایشگاه مبدأ برخلاف شماره‌ی پاساژ متغیرهای کمی و محرک اصلی تغییر در mRNA، miRNA و پروفایل متیلاسیون بودند. در رابطه با پروفایل متیلاسیون، سلول منشأ نقش مهمی ایفا می‌کرد؛ اما ارتباط واضحی با تفاوت‌های موجود در پروفایل‌های متیلاسیون سوماتیک وجود نداشت (Salomonis et al. 2016). براساس آنالیز ۷۱۱ رده از ۳۰۱ فرد سالم، بین ۵ تا ۴۶٪ تنوع مشاهده شده در فنوتیپ‌های iPSC مانند تنوع در سنجش‌های سراسری ژنوم، رنگ‌آمیزی ایمنی پروتئین، ظرفیت تمایز و مورفولوژی سلولی به دلیل تفاوت‌های بین فردی بوده و این تنوع

4. imprinting

5. functional pathway analysis

6. embryoid bodies

1. genome-wide association studies

2. batch

3. Sendai virus lot

بوده است (Burrows et al. 2016). درواقع، اگر تنوع بین افراد به شکل مناسبی تصحیح نشود، تفاوت‌های رونویسی بین iPSC ها و ESC ها و نیز بین iPSC های مربوط به منشأ بافت سوماتیکی متفاوت بیش از واقعیت به نظر می‌رسد (Rouhani et al. 2014). با در نظر گرفتن رده‌های ESC و iPSC جفت شده از نظر ژنتیکی، زمینه‌ی ژنتیکی نسبت به دو عامل منشأ سوماتیکی یا روش برنامه‌ریزی مجدد با استفاده از ویروس Sendai، اثر بیشتری بر تنوع رونویسی داشته است (Choi et al. 2015). باین حال اگر سهم ژنتیک کنار گذاشته شود، iPSC های مشتق از کاردیومیوسیت‌های بطنی موشی نسبت به (۱) ESC های جفت شده از نظر ژنتیکی یا (۲) iPSC های فیبروبلاست‌های سری-دمی^۱، تمایل بیشتری به تمایز خودبه‌خودی به سمت کاردیومیوسیت‌های شبه‌بطنی دارند. به نظر می‌رسد که ترنسکرپتوم‌های خاص و متیلاسیون ویژه موجود در DNA شامل پروموتور ژن‌های قلبی، علت آن باشد (Xu et al. 2012). کارایی تمایز قلبی همچنین برای iPSC های مشتق از سلول پیش‌ساز قلبی در مقایسه با iPSC های مشتق از فیبروبلاست احتمالاً به دلیل متیلاسیون افتراقی در پروموتور 5-NKX2، بالاتر است. باین وجود، این تفاوت‌های اپی‌ژنتیکی با پاساژ دادن کاهش یافته و هیچ تفاوت قابل توجهی در مورفولوژی، جابه‌جایی کلسیم یا الکتروفیزیولوژی کاردیومیوسیت‌های حاصل دیده نمی‌شود. به علاوه، این سلول‌ها در مدل گرفتگی میوکاردیال موشی اثر درمانی مشابهی داشتند (Sanchez-Freire et al. 2014). برای تعیین منشأ این تنوع، ما (نویسندگان کتاب) در آزمایشگاه از طریق مقایسه‌ی کلون‌های iPSC موشی، رویکردی را برای خنثی‌سازی اثر منشأ سوماتیکی بر پروفایل‌های متیلاسیون و رونویسی iPSC های حاصل ابداع کرده‌ایم. مشخص شد که سطوح بیانی دو ژن پرتوانی Oct4 و Zfp42 علی‌رغم نوع منبع سلولی یا استراتژی برنامه‌ریزی مجدد، کاردیومیوژنیسته را افزایش می‌دهد؛ بنابراین راهی برای تعیین تنوع کلونال فراهم می‌کند (Hartjes et al. 2014).

نقش منبع سلول سوماتیک در ناهنجاری‌های سلولی یکی دیگر از نگرانی‌های بالقوه است. iPSC های مشتق از خون در مقایسه با iPSC های سایر منابع سوماتیکی، به احتمال کم‌تری دچار نابه‌جایی در متیلاسیون DNA می‌شوند (Nishizawa et al. 2016). در مورد انحرافات ژنتیکی، مشخص شده که رده‌های iPSC به‌طور میانگین دو CNV دارد که در فیبروبلاست‌های منشأ قابل تشخیص نیستند؛ باین وجود با استفاده از تکنیک‌های حساس‌تر می‌توان دید که حداقل ۵-۱۰٪ این CNV ها درواقع تغییرات ژنومی سوماتیکی رایج

در فیبروبلاست‌های والدی هستند که به دلیل منشأ کلونال iPSC ها آشکار شده‌اند. تخمین زده شده که حدوداً ۳۰٪ فیبروبلاست‌ها CNV های سوماتیک دارند (Abyzov et al. 2012). همچنین باتوجه به بررسی SNV ها در iPSC های موشی مشخص شد که بیشتر جهش‌های ایجاد شده، پیش از برنامه‌ریزی مجدد (البته در فراوانی آلی بسیار پایین) رخ داده است و توسط iPSC ها با توجه به طبیعت کلونال آن‌ها دریافت شده؛ باین وجود برخی جهش‌ها ممکن است دیرتر رخ بدهند (Young et al. 2012; Li et al. 2015). در یک مطالعه، ۴ گروه جهش سوماتیک شناسایی شده است: کلونال، ساب‌کلونال، جهش‌های تخریب با UV و تغییرات تعداد کپی‌ها. بیشتر جهش‌های نقطه‌ای در نواحی سرکوب‌شده کروماتینی یافت شده است؛ بنابراین بر بیان ژن iPSC ها اثر نمی‌گذارد. باین حال، جهش‌های ساب‌کلونال مربوط به تغییر افزایشی بیان ژن بودند. علاوه بر این، تغییر بیان در بیش از یک سوم ژن‌های تحت اثر تغییر در تعداد نسخه‌ها دیده شد. جهش‌هایی که نمی‌توانند بر بیان ژن در iPSC ها اثر بگذارند، می‌توانند بالقوه بر بافت‌های تمایز یافته اثرگذار باشند؛ بنابراین قطعاً نباید از آن‌ها صرف‌نظر کرد. جهش‌های تخریب با UV، در ۵۰٪ iPSC های فیبروبلاست پوستی یافت شدند. باین وجود، تعداد جهش‌های رخ داده در ژن‌های سرطانی نسبت به رقم مورد انتظار براساس رخداد تصادفی، تفاوت قابل توجهی نداشت (D'Antonio et al. 2018).

در چند سال اخیر آشکار شده که جهش‌های DNA میتوکندریایی (mtDNA) می‌تواند بین رده‌های iPSC متفاوت باشد. براساس مطالعات انجام‌گرفته، هر فیبروبلاست می‌تواند جهش‌های منحصربه‌فردی را حمل کند و آن جهش‌های موجود در iPSC ها ممکن است در سطوح بسیار پایین‌تر در فیبروبلاست‌های والدی موجود باشند (بنابراین حتی ممکن است در آنالیز کلی بافت قابل تشخیص نباشند). این جهش‌ها ممکن است حتی هموپلاسمیک یا در وضعیت هتروپلاسمی بالا باشند. گزارش شده که iPSC های مربوط به بزرگسالان مسن‌تر نسبت به افراد جوان جهش‌های mtDNA بیشتری دارند و حتی رده‌های iPSC مشتق از خون ممکن است جهش‌های میتوکندریایی داشته باشند. این جهش‌ها متعاقباً می‌تواند منجر به اختلالاتی در عملکرد متابولیکی و تنفس سلولی شود (Kang et al. 2016). اخیراً محققان نشان داده‌اند درحالی‌که می‌توان سلول‌های سوماتیک موشی دارای میزان جهش بالا در mtDNA را مجدد به iPSC ها برنامه‌ریزی کرد؛ سلول‌های حاصل دچار تکثیر پایین و اختلال در تمایز خواهند بود (Wahlestedt et al. 2014). براساس گزارشی از آزمایشگاه ما، حتی در افراد سالم